



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶: C12N 15/63, 15/00, 5/00, A61K 31/70, A01N 43/04	A1	(11) International Publication Number: WO 98/44131 (43) International Publication Date: 8 October 1998 (08.10.98)
(21) International Application Number: PCT/US98/05704 (22) International Filing Date: 27 March 1998 (27.03.98) (30) Priority Data: 06/042,090 28 March 1997 (28.03.97) US (71) Applicant (for all designated States except US): WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH [-/US]; Dept. of the Army, Washington, DC 20307 (US). (71)(72) Applicants and Inventors: SADOFF, Jerald, C. [US/US]; 1622 Kalmia Road, N.W., Washington, DC 20012 (US). GROVE, Jason, C. [US/US]; 17932 Ashton Club Way, Ashton, MD 20861 (US). (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): SIZEMORE, Donata, R. [US/US]; 1420 Peacock Lane, Brentwood, MO 63144 (US). (74) Agent: HARRIS, Charles, H.; United States Army Medical Research and Material Command, 504 Scott Street, Fort Detrick, MD 21702 (US).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
(54) Title: ANTIMICROBIAL MEDIATED BACTERIAL DNA DELIVERY		
(57) Abstract <p>This invention pertains in part to a method for delivering functional DNA or antigens. The desired DNA is introduced into attenuated bacteria able to enter cells. Once the bacteria is in the cell, antimicrobial agents are introduced such that they enter the mammalian cell and lyse the bacteria thereby allowing the delivery of carried functional DNA or antigens. The advantages of this method and its uses are described.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
RJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

TITLE OF THE INVENTION

Antimicrobial Mediated Bacterial DNA Delivery

5

INTRODUCTION

10

This invention relates to a method for introducing functional nucleic acids into cells using a bacterial delivery system. A bacterial vector capable of delivering functional nucleic acids to cells can be produced by introducing a bacterial plasmid containing promoters and other sequences containing
15 instructions recognized by eukaryotic cells into bacteria capable of invading cells, being taken up by cells, or interacting with cells in such a way as to have the nucleic acids reach the eukaryotic cell cytoplasm. The nucleic acids delivered to the cell in this way can direct the eukaryotic cell to produce antigens or other functional molecules.

20

These unique bacterial delivery systems therefore can be used as vaccines to prevent or treat infectious diseases and cancer, down regulate the immune system in the case of tissue rejection in transplantation, prevent or treat autoimmune diseases and other diseases related to dysregulation of the immune system. In addition, the bacterial delivery systems can be used for gene therapy
25 or gene replacement for treatment or amelioration of disease such as hereditary genetic diseases, cancers and virus infections.

25

Direct DNA-mediated immunization is another approach to the introduction of functional nucleic acids and vaccine development. Highly purified bacterial plasmid DNAs expressing desired proteins under the control of
30 viral promoters have been injected primarily into muscle or skin by traditional needle and syringe or by other more exotic methods such as biolistic transfection with DNA-coated gold microparticles (for review see Donnelly, J.J. *et al. J. Immunol. Methods* (1994) **176**: 145) (All documents cited herein *supra* or *infra* are hereby incorporated by reference). Investigators using this technology have
35 been able to elicit neutralizing antibodies, cytotoxic T lymphocytes and

30

35

protection against challenge in several animal models of infection ranging from influenza to malaria. The use of bacteria as a delivery system as described in this invention is a unique method of delivering DNA to mammalian cells and has the potential to provide a simple, inexpensive way of extending DNA

- 5 immunization to the local immune system and beyond through oral and other mucosal routes of immunization.

Previously, live bacteria have been utilized as vaccines in order to protect against subsequent infection. Attenuated or less virulent *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria*, and other bacteria have been given orally to immunize against

10 subsequent infection with more virulent forms of these bacteria. Likewise, attenuated bacterial and mycobacterial organisms such as Bacille Calmette-Guerin (BCG) have been administered parenterally to protect against related organisms such as *M. tuberculosis*. Genes from bacteria, viruses and parasites have been cloned into a variety of bacteria and mycobacteria for the purpose of

15 directing the bacteria to express the foreign antigen or impart on the bacteria certain desired properties for use as a live vaccine. Examples include cloning the invasion genes of *Shigella* into the normally non-invasive *E. coli* rendering the *E. coli* invasive and therefore more suitable for use as a vaccine strain, or cloning of *P. falciparum* malaria genes into *Salmonella typhimurium* which

20 subsequently express these malaria proteins and, following oral administration of the bacteria, induce specific cytotoxic T cell immunity and protection in mice against malaria challenge (Sadoff *et al. Science* (1988) **240** :336-338; Aggrawal *et al. J. Exp. Med.* (1990) **172**:1083-1090). All of these bacterial delivery systems require the bacteria itself to produce the antigen or functional molecule

25 and are dependent on a bacterium which is sufficiently attenuated to be safe for use in humans, but still able to induce a protective response. The bacterial delivery system of the present invention is designed to deliver functional nucleic acids which are then transcribed and translated as directed by the eukaryotic machinery to produce foreign antigens or functional molecules. In this case,

30 antigen toxicity which is often seen when using live attenuated bacterial carriers expressing foreign proteins/peptides is eliminated because the expression occurs within the mammalian via its own machinery. This also will allow for any secondary modifications required of the protein; thus, permitting the protein to take a more characteristic/natural form for processing and presentation to the

immune system or to direct a cellular function. In addition, if desired, it can be used to deliver prokaryotically produced antigens and functional molecules.

This invention can be applied to any desired bacteria. We chose *Shigella* as an example of a bacterial delivery system because of its ability to invade cells, escape from the endocytic vacuole, and enter into the cytoplasm of eukaryotic cells. These properties are not required of a bacteria chosen for application of the present invention, but simplified the experimental system. *Shigellae* are enteric pathogens that invade the human colonic epithelium and multiply intracellularly, causing bacillary dysentery. Bacillary dysentery is caused by all members of the genus *Shigella* (*S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, and *S. sonnei*). Shigellosis is prevalent in developing countries, but is also found in industrialized nations, especially in institutional settings. It has been estimated that Shigellosis is the cause of half a million deaths a year, mostly among children, making the development of a safe and effective *Shigella* vaccine important (Stole, B. J. *et al. J. Infect. Dis.* (1982) **146**: 177). To cause dysentery, *Shigella* strains must be able to recognize, invade and multiply within epithelial cells of the colon (LaBrec, E. H. *et al. J. Bacteriol.* (1964) **88**: 1503). Both the bacteria and host cell play a role in the invasive process wherein the host cell actively engulfs the bacteria which in turn escapes from the phagosome by a bacteria-mediated digestion of the phagosomal membrane (Sansone, P. J. *et al. Infect. Immun.* (1981) **34**: 75). Once in the cell, bacterial multiplication occurs resulting in host cell necrosis.

SUMMARY

In this invention is described a method for delivering DNA to cells. The method of the present invention includes the introduction of the desired DNA into bacteria, allowing the bacteria to infect or enter cells, and then lysing the bacteria inside the cells such that the desired DNA is released. Even though a specific bacteria is described herein and is shown to deliver nucleic acids to eukaryotic cells, this invention is applicable to all bacteria and mycobacteria. Plasmids introduced into other cells such as plant cells may also render these cells capable of delivering nucleic acids.

Specifically, the method of the present invention uses an attenuated bacterial strain which is sufficiently attenuated to not cause disease, while still maintaining the ability to enter mammalian cells. The attenuated strain used in

the method of the present invention does not carry genetic mutations specifically designed to lyse the carrier and mediate delivery of plasmid DNA. Since the bacterial strain is not engineered to lyse, delivery of the DNA in the cell is mediated by alternative methods, such as, for example, the use of antimicrobial agents. The *Shigella flexneri* strain used as a model in the present invention, SC602, carries mutations in the *icsA* gene required for intracellular spread and aerobactin (*iuc::iut*) and was described in Barzu *et al.*, *Infection and Immunity* 64: 1190-1194 (1996). Once the attenuated bacteria containing the DNA to be delivered is inside the cell, antimicrobials are introduced which eliminate the bacteria and allow the release of intact DNA into the cell.

The advantage of the method of the present invention is that any bacterial strain can be used; so long as the strain meets the following criteria: attenuated for use in humans or other animals, invasive, and exits or breaks down the endocytic or phagocytic vacuole in such a way as to allow the release of functional DNA. Therefore, one can take advantage of the higher level of invasiveness afforded other attenuated bacterial strains thereby increasing the number of mammalian cells infected, and thus the number of mammalian cells expressing the foreign protein or peptide once the bacteria is lysed inside the cell.

Therefore, it is one object of the invention to provide a delivery vehicle for the delivery of DNA to cells. The DNA encoding desired gene(s) or antigen(s) along with control sequences can be introduced into attenuated bacteria, and the recombinant attenuated strain allowed to enter mammalian cells after which antimicrobials able to lyse the bacteria are introduced such that the bacteria is lysed and DNA delivery is mediated. Such a delivery vehicle could be used for oral and other mucosal immunization and gene therapy strategies.

It is another object of the present invention to provide a *Shigella* delivery vehicle for the delivery of DNA to mucosal surfaces. The DNA encoding desired gene(s) or antigen(s) can be introduced into attenuated *Shigella*, the recombinant attenuated *Shigella* strain allowed to enter mammalian cells, after which, antimicrobials able to lyse the *Shigella* are introduced such that the *Shigella* is lysed and DNA delivery is mediated. Such a delivery vehicle could be used for oral and other mucosal immunization and gene therapy strategies.

It is still another object of the present invention to provide a method for the delivery of heterologous foreign antigens expressed by attenuated bacteria,

more specifically *Shigella*, for the purpose of inducing in an individual an immune response against the foreign antigen or for treatment of a disease wherein said foreign antigen is missing or found in reduced amount.

It is further another object of the invention to provide a delivery vehicle
5 for delivery of functional DNA and antigens to cells *in vitro* for use of those cells in, for example, transplantation and gene therapy. The DNA encoding desired gene(s) or antigen(s) can be introduced into attenuated bacteria, and the recombinant attenuated strain allowed to enter cells *in vitro* afterwhich, antimicrobials able to lyse the bacteria are introduced such that the bacteria is
10 lysed and DNA delivery is mediated.

It is yet another object of the invention to provide a general method for introducing functional DNA into cells using bacterial delivery systems. The desired functional DNA is introduced into an attenuated bacteria able to enter or infect cells afterwhich, an antimicrobial is used to lyse the bacteria inside the cell
15 such that the DNA is released in the cell. This method can be used for inducing protective immunity as a vaccine, for preventing and treating tumors, for the therapy and treatment of autoimmune disorders, for the treatment of conditions related to dysfunction of the immune system, for transplantation, for gene replacement, and gene therapy.

20

DETAILED DESCRIPTION

The present invention describes a method for delivery of DNA into cells. The method of the present invention comprises the steps of introducing the desired DNA along with control sequences into a bacteria able to enter cells, and
25 then lysing the bacteria inside the cells such that the DNA is delivered and expressed by the cell. This process is generally applicable to all bacteria and mycobacteria.

By 'control sequences' is meant DNA sequences which are necessary to effect the expression of coding sequences to which they are operably linked. By
30 'operably linked' is meant a juxtaposition wherein the components are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence 'operably linked' to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. Generally, such control sequences include promoter and
35 ribosome binding site. Promoters can be specific for the cell type where the

antigen is to be expressed. In addition, promoters can be constitutive, expressed continuously, or can be inducible such that the expression of the DNA or antigen can be regulated. The term 'control sequences' is intended to include, at a minimum, all components whose presence is necessary for expression, and may also include additional components whose presence is advantageous, for example, enhancers to increase expression of the antigen. Control sequences specific for different cell types and conditions are well known in the art. The combination of control sequences and desired DNA encoding the antigen of interest will be referred to hereafter as 'functional DNA'

Specifically, the present invention describes a method for delivery of functional DNA into cells, said method comprising introducing functional DNA into an attenuated *Shigella* strain, the *Shigella* allowed to invade and enter the eukaryotic cell, and then lysed inside the cell using antimicrobial agents capable of entering the cell and lysing the bacteria thereby releasing the desired functional DNA.

More specifically, the desired functional DNA encoding a desired antigen along with control sequences is introduced into SC602, an attenuated *Shigella flexneri* 2a strain containing a deletion in the *icsA* gene required for intracellular spread and aerobactin (*iuc::iut*) [described in Barzu, *et al.*, 1996, *supra*]. The recombinant SC602 is allowed to invade and enter the eukaryotic cells of the epithelial mucosa and antimicrobial agents are introduced which enter the infected eukaryotic cells and lyse the bacteria thereby releasing the functional DNA into the eukaryotic infected cells.

In accordance with the present invention, any attenuated bacterial strain can be used. The bacteria does not need to be virulent, but preferably should have the ability to enter or be taken up by the target cell and be attenuated to such an extent that clinical symptoms be acceptable. In addition, the bacteria must be sensitive to the antimicrobial to be used. Examples of such bacteria include *Listeria*, enteroinvasive *E. coli*, *Rickettsia*, or engineered *E. coli* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Klebsiella* spp., *Bordetella* spp., *Hemophilus* spp., *Brucella* spp., *Helicobacter* spp., *Bacillus* spp., to name a few.

In accordance with the present invention, any gene or genes can be introduced into the bacterial chromosome or virulence plasmid by methods described above, or alternatively can be carried by the bacteria in a replicating or nonreplicating plasmid. The vectors of interest can be introduced via

transformation, electroporation, transfection or conjugation. Genes for immunizations would include genes encoding foreign antigens from organisms causing, for example, diarrheal diseases such as rotavirus, sexually transmitted diseases such as human immunodeficiency virus, *Neisseria gonorrhoeae*, and human papilloma virus, and gastrointestinal diseases such as the ulcer causing *Helicobacter pylori*. In the model of the present invention, the attenuated *Shigella* was shown to deliver functional DNA and antigens to cells.

Specifically, the use of *Shigella*, as a bacterial delivery may permit mucosal immunization simultaneously with multiple antigens that can be directed for class I and/or class II presentation, stimulation of Th1 or Th2 help, or secreted while maintaining the proper folding and conformational epitopes for IgA and IgG antibody production.

Similar methods can be used for the delivery of functional DNA for gene therapy and correction of inborn errors of metabolisms. Such genes would include, for example, replacement of defective genes such as the CFTR gene for cystic fibrosis or introduction of new genes such as reverse transcriptase or protease antisense genes for the treatment of HIV or genes to upregulate Th1 immune responses such as interleukin-12 (IL-12) or genes to up- or down-regulate certain receptors, metabolites or hormones such as cholesterol and cholesterol receptors, insulin and insulin receptors, or genes encoding products that can kill cancer cells such as Tumor Necrosis Factor (TNF), or genes to upregulate systems that have decreased for a variety of reasons including aging such as secretion of growth hormone, stimulation of osteocytes to promote bone growth, and down regulation of osteoclasts to decrease bone desorption.

Delivery of functional DNA can also be used to downregulate the immune system in an antigen specific manner or general manner in order to prevent or control autoimmune diseases or other diseases involved in dysregulation of the immune system or for prevention or treatment of specific diseases or conditions including transplantation. Examples include the prevention or treatment of autoimmune encephalitis, multiple sclerosis, lupus erythematosus, diabetes melitus, Crohn's disease and other inflammatory bowel diseases, and rheumatoid arthritis and other inflammatory joint and skin diseases. Other examples include down regulation of immune responses that inhibit appropriate protective or curative immune responses such as down regulation of immune responses that distract from protective and curative

immune responses to cancer and other diseases. For example, down regulation of Th2 responses when Th1 responses are appropriate for prevention and treatment of cancer, *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*, and HIV. This can be accomplished using this methodology through manipulation of the unique immunosuppressive properties of the gut and other local immune systems in combination with the ability to code for production of the appropriate cytokine milieu for induction of the appropriate immune response and suppression of inappropriate responses.

In accordance with the present invention, the bacteria is lysed inside the cell to release and deliver the desired functional DNA. Methods for lysing bacteria inside cells include the use of a drug or antimicrobial agent capable of entering the cells to a sufficient level, and has the properties of affecting the synthesis of the bacterial cell wall or other bacterial cell membrane component, or able to form holes/pores in the bacterial cell wall or membrane. Antimicrobial agents include any agent which inhibits the growth of or kills the bacteria. The agent can be manmade or produced or derived from a living organism such as an antibiotic. For a list of bacteria and the antibiotics given as treatment, please see G. L. Mandell, R.G. Douglas Jr, J.E. Bennett. Principles and Practices of Infectious Diseases. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. Early antimicrobial research yielded a very effective drug for treating *Shigella* and other intracellular bacteria, azithromycin [Kitzis *et al.* (1990) *J. Antimicrob. Chemother.* **25**: Suppl.A. 15-18; Gordillo *et al.* (1993) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**:1203-1205]. Azithromycin is biochemically similar to erythromycin; it prevents the ribosome from ejecting the P-site tRNA and moving on to replace it with the A-site tRNA during transcription, thus inhibiting protein synthesis (Retsema, 1987). Its advantage over erythromycin is that it enters the mammalian cell at a higher concentration; therefore intracellular bacteria are killed more efficiently [Gladue *et al.* (1989) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 277-282; Gladue and Snider (1990) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**: 1056-1060; McDonald and Prull (1991) *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* October 1991: 828-833].

The concentration and time of addition of the antimicrobial can be determined empirically for each bacterium. The time of addition of an antimicrobial agent is based upon the time when the bacteria leaves the endocytic vacuole (preferably after the bacteria have exited the endocytic vacuole, and

prior to the destruction of the cultured cell). The concentration to be added should be an amount able to enter cells and act on the bacterium.

In another embodiment, the present invention relates to a method for the introduction of antigens of interest into cells. Such a method would comprise
5 introduction of the desired functional DNA or antigen into attenuated bacteria, for example *Shigella*, such that the desired antigens are produced, administering said bacteria to an individual, and administering a bacterial lysing agent or antimicrobial such that the bacteria is lysed in the cell and antigens are introduced into the cell. Said antigens can be produced during the life cycle of
10 the bacteria prior to entering said cells. These antigens can be expressed from a prokaryotic promoter, and can either be constitutively expressed or induced. Such genes include those from parasitic organisms for which an immune response is desired.

In another embodiment, the present invention relates to a method for the
15 introduction of DNA or antigens of interest into cells *in vitro*. Such a method would comprise introduction of the desired functional DNA or antigen into attenuated bacteria such that the desired antigens are produced, administering said bacteria to cells, and lysing said bacteria in cells thereby mediating delivery of DNA or antigens of interest into cells. The bacteria chosen as a delivery
20 vehicle would depend on the cell type into which the functional DNA is to be introduced. *Shigella*, for example infects several different cells types, such as BHK (baby hamster kidney cells), HeLa (Human cervical epitheloid carcinoma), and CaCo-2 (human colonic adenocarcinoma) and is therefore capable of delivering desired DNA or antigens into these cells wherein said
25 DNA can be expressed. Cells into which functional DNA has been delivered can be transplanted for therapeutic purposes, used for gene therapy or used as reagents in diagnostic assays.

Current methods for introducing functional DNA or antigens into cells *in vitro* require purified DNA in ug amounts. The functional DNA is then added to
30 their liposomes or other matrix, allowed to mix, then added onto the cells. The mixture is usually toxic to cells and may require several attempts to adjust the amount or ratio of functional DNA and matrix such that the DNA-matrix mixture is taken up by the cells. The method of the present invention presents advantages in that a bacterial strain or strains can be designed in which the
35 investigator can do their desired cloning and selection. This strain would then

act as a delivery vehicle to carry their cloned product to cultured mammalian cells with no need to purify the DNA and the clone containing the desired functional DNA selected in a short period of time.

Another embodiment of the present invention is the use of the method as
5 a vaccine delivery system. The attenuated bacterial strain containing the functional DNA of interest can be used as an immunizing agent against infection. The attenuated bacterial vaccine of the present invention can be prepared in the form of a mixed vaccine which contains one strain or several different strains of attenuated bacteria with the same or a different DNA for each
10 to deliver to the same cell or a different cell by selecting bacteria which are capable of infecting the target cell. Further, the vaccine can include at least one other antigen as long as the added antigen does not interfere with the effectiveness of the attenuated bacterial vaccine and the side effects and adverse reactions, if any, are not increased additively or synergistically. Once the
15 functional DNA encoded immunogen is released in the cells as a result of lysing the bacteria, the cell is capable of producing the antigen, presenting it to the immune system for production of protective antibodies and/or cellular mediated immunity.

Vaccines are prepared for oral administration, either as liquid solutions
20 or suspensions; solid form suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to administration. The preparation may also be emulsified, or the ingredients are often mixed with excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions take the form of solutions,
25 suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations, nose drops or powders and contain about 10^{-10} to 10^{12} attenuated bacteria.

Vaccines can also be in the form of injectables. Suitable excipients would include, for example, saline or buffered saline (pH about 7 to about 8), or other physiologic, isotonic solutions which may also contain dextrose,
30 glycerol or the like and combinations thereof. However, agents which disrupt or dissolve lipid membranes such as strong detergents, alcohols, and other organic solvents should be avoided. In addition, if desired, the vaccine may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, and/or adjuvants which enhance the effectiveness

of the vaccine. Examples of adjuvants which may be effective include but are not limited to: aluminum hydroxide, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (CGP 19835A, referred to as MTP-PE), and TIBI, which contains three components extracted from bacteria, monophosphoryl lipid A, trehalose dimycolate and cell wall skeleton (MPL+TDM+CWS) in a 2% squalene/Tween 80 emulsion. The effectiveness of an adjuvant may be determined by measuring the level of desired immune response directed against the bacteria, carried antigen, or DNA encoded antigen resulting from administration of the attenuated bacteria, in vaccines which are also comprised of the various adjuvants.

The vaccine can be administered in the form of a liquid or suspension prepared as discussed above. Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories. Additionally, the vaccine can be lyophilized. For suppositories, traditional binders and carriers may include, for example, polyalkylene glycols or triglycerides; such suppositories may be formed from mixtures containing the attenuated bacteria enough to generate the desired immune response, i.e., protection or reduction of disease incidence or severity without causing undesirable, adverse side effects, generally in a range of 10^{-10} to 10^{12} colony forming units of attenuated bacteria per dose.

Generally, the vaccine may be administered orally, subcutaneously, intradermally, or intramuscularly in a dose effective for the production of the desired immune response. The vaccines are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as will be prophylactically and/or therapeutically effective. The quantity to be administered, which is generally in the range of or 10^0 to 10^{12} colony forming units of attenuated and/or attenuated/inactivated bacteria per dose, depends on whether it is acting as a vaccine to bacteria or a carrier of heterologous antigens or DNA, on the subject to be treated, capacity of the subject's immune system to develop the desired immune response, and the degree of protection desired. Precise amounts of the vaccine to be administered may depend on the judgement of the practitioner and may be peculiar to each subject, antigen, or use of the bacteria as a vaccine or carrier.

The vaccine may be given in a single dose schedule, or preferably a multiple dose schedule in which a primary course of vaccination may be with 1-10 separate doses, followed by other doses given at subsequent time intervals required to maintain and or reinforce the immune response, for example, at 1-4 months for a second dose, and if needed, a subsequent dose(s) after several months. The dosage regimen will also, at least in part, be determined by the need of the individual and be dependent upon the judgment of the practitioner. Examples of suitable immunization schedules include: (i) 0, 1 month and 6 months, (ii) 0, 7 days and 1 month, (iii) 0 and 1 month, (iv) 0 and 6 months, or other schedules sufficient to elicit the desired immune responses expected to confer protective immunity, or reduce disease symptoms or reduce severity of disease.

Described below are examples of the present invention which are provided only for illustrative purposes, and not to limit the scope of the present invention. In light of the present disclosure, numerous embodiments within the scope of the claims will be apparent to those of ordinary skill in the art.

The following MATERIALS AND METHODS were used in the examples that follow.

Bacteria: The attenuated vaccine strain of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T, 15D and 15D(pCMV β) has been described elsewhere (Sizemore *et al.* (1995) *Science* **270**:299-302). Briefly, 15D carries a mutation in the *asd* gene and is therefore genetically programmed to die when it tries to divide. The *Shigella* strain SC602 was obtained from P. Sansonetti. pCMB β expresses *E. coli* β -galactosidase under the control of the immediate early promoter and enhancer from the human cytomegalovirus (CMV) in mammalian cells, which permitted us to easily analyze mammalian-mediated gene expression after delivery [MacGregor and Caskey (1989) *Nucl. Acids Res.* **17**:2365].

Mammalian Cells: The cell line used throughout these experiments was that of the baby hamster kidney (BHK) obtained from ATCC. BHK cells were grown in complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM (Biowhitaker), containing 10% newborn calf serum and 1% L-glutamine. These adherent cells were grown on polystyrene tissue culture ware at 37°C and 5% CO₂. Cells are routinely used at a time when semi-confluence is reached.

Antibiotics: Powdered purified azithromycin was obtained from Maj.

Kyle. Oral formulation of ciprofloxacin was obtained from Maj. Fleckenstein.

Reagents to measure β -galactosidase activity:

Phosphate buffered saline: 8.5 g/L NaCl, 5.75 g/L Na_2HPO_4 , 1.0 g/L

5 KH_2PO_4 , sterile filtered.

PM-2 buffer: 20 mM NaH_2PO_4 , 80 mM NaHPO_4 , 0.1 mM MnCl_2 ,

2 mM MgSO_4 , 40 mM β -mercaptoethanol, pH 7.3, sterile filtered.

ONPG reagent: 4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside in PM-2 buffer.

10 Dissociation buffer: 8 M urea, 100 mM Tris, 5% SDS

Edda Twiddy's EDTA: 0.5 g EDTA, 0.4 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.05 g NaH_2PO_4 , 0.06 g KH_2PO_4 in 1 liter water, pH 7.6, sterile filtered

The protocol used for these experiments consisted of diluting an overnight culture of the bacteria 1 in 50 and allowing it to grow to midlog phase,

15 approximately 2.5 hours. The midlog cultures were then concentrated in Hank's Balanced Salts by centrifugation to approximately 10^9 bacteria per milliliter and a small aliquot was taken to determine the midlog bacterial count.

Two milliliters of bacteria were added to the appropriate semi-confluent flask of BHK cells and allowed to incubate for ninety minutes at 37°C and 5% CO_2 .

20 After the incubation, the cells were rinsed with Hank's Balanced Salts (Sigma). In most cases the flasks were treated with complete DMEM containing 20 mg/ml gentamicin to kill all extracellular bacteria. Either antibiotic was then added at the designated time.

Demonstration of DNA Delivery:

25 Harvesting of cells was carried out as follows. At the appropriate time point media was removed from the flasks and the flasks were rinsed thoroughly with Hank's Balanced Salts followed by Edda Twiddy's EDTA. Flasks were then treated with 5 milliliters of Trypsin-EDTA for 5 minutes at 37°C and 5% CO_2 to lift the adherent mammalian cells from the flask. Ten milliliters of room temperature DMEM with serum was added to inactivate the Trypsin-EDTA. The

30 The cells were pelleted at 2000 rpm for 12 minutes at room temperature and resuspended in 10 milliliters of phosphate buffered saline (PBS).

A 100 μl aliquot was taken and diluted in 0.1 % Triton X-100 and plated on diaminiopimelic acid (DAP) supplemented congo red (Sigma) tryptic soy agar

35 for 15D or TSA without DAP for SC602. The remainder was again pelleted and

resuspended in 1.3 ml PM-2 buffer. 30 μ l of 10% Triton X-100 was added and the sample was incubated at room temperature and vortexed frequently for ten minutes to lyse the BHK cells. The cellular debris was pelleted for 20 minutes at 13500 x g and 4°C.

- 5 Four hundred microliters of the supernatant was combined with 400 μ l of PM-2 buffer in a spectrophotometric cuvette and allowed to equilibrate to 37°C. 200 μ l of ONPG reagent is then added to each sample and any applicable standards. The samples were incubated at 37°C and timed until a vibrant yellow color appeared, at which point the reaction was complete. The absorbance of
10 each sample was measured at 420 nm and recorded. β -galactosidase activity was calculated as $\text{Ab}_{420} \times 380 / \text{Time (minutes)}$. To determine the total amount of protein present in each assayed sample 200 μ l of cold (-20°C) acetone was added to 50 μ l of the above supernatants, vortexed thoroughly and stored at -20°C for 30 minutes. The samples were then pelleted for 10 minutes at 14000
15 rpm and the supernatant was discarded. Samples were allowed to dry in a heated evacuating centrifuge and then resuspended in 50 μ l dissociation buffer. The protein concentration was then determined using a standard BCA (Pierce) protein determination protocol. Results are reported as β -galactosidase activity per mg of protein.

20

EXAMPLE 1

Use of Azithromycin to Mediate DNA Delivery

- Early antibiotic research yielded a very effective drug for treating *Shigella* and other intracellular bacteria, azithromycin (Kitzis, 1990, *supra*;
25 Gordillo, 1993, *supra*). Azithromycin is biochemically similar to erythromycin; it prevents the ribosome from ejecting the P-site tRNA and moving on to replace it with the A-site tRNA during transcription, thus inhibiting protein synthesis [Retsema *et al.* (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1939-1947]. Its advantage over erythromycin is that it enters the mammalian cell at a higher
30 concentration; therefore intracellular bacteria are killed more efficiently (Gladue, 1989, 1990, *supra*; McDonald and Prull, 1991, *supra*). For these experiments, complete DMEM containing the designated concentrations of the azithromycin were added to flasks of infected BHK cells at various times to determine an effective inhibitory concentration and the appropriate time for addition of the
35 antibiotic to mediate DNA delivery (Table 1). Treated cells were harvested

- within 24 hours of introducing the azithromycin. Results of β -galactosidase assays performed on cell lysates of BHK cells infected with either SC602 or SC602(pCMV β) treated with azithromycin revealed an observable amount of activity only from those cells that had been infected with SC602(pCMV β) and treated with azithromycin. The results also indicated that addition of the azithromycin 1 to 2 hours after the adherence and invasion step greatly increased the amount of β -galactosidase activity detected as compared to those monolayers treated just after the adherence/invasion step. At this time the bacteria have had the greatest chance to leave the endocytic vacuole and most likely inhabit the cytoplasm at the time the antibiotic begins to act; thus the plasmid DNA is in the appropriate cellular compartment to make its way to the nucleus.

Table 1. Azithromycin-mediated bacterial plasmid DNA delivery.

		β -galactosidase activity/mg	Bacterial Counts
Experiment	Strain	U/mg	Bact./Flask
Midlog	SC602		$1.7(10^6)$
Midlog	SC602 pCMV β		$1.4(10^6)$
24hr gentamicin, no azith.	SC602	0	$6.4(10^4)$
24hr gentamicin, no azith	SC602 pCMV β	0	$3.5(10^4)$
azith 30ug/ml at time 0	SC602	0	$2.7(10^4)$
azith 30ug/ml at time 0	SC602 pCMV β	6.2	$5.4(10^4)$
azith 60ug/ml at time 0	SC602	0	$8.0(10^4)$
azith 60ug/ml at time 0	SC602 pCMV β	7.7	$10.1(10^4)$
azith 120ug/ml at time 0	SC602	0	$2.3(10^4)$
azith 120ug/ml at time 0	SC602 pCMV β	8.5	$5.4(10^4)$
azith 30ug/ml at time 1 hour	SC602	0	$1.5(10^4)$
azith 30ug/ml at time 1 hour	SC602 pCMV β	26.0	$1.8(10^4)$
azith 60ug/ml at time 1 hour	SC602	0	$9.2(10^3)$
azith 60ug/ml at time 1 hour	SC602 pCMV β	25.6	$4.0(10^2)$
azith 30ug/ml at time 2 hours	SC602	0	$1.3(10^4)$
azith 30ug/ml at time 2 hours	SC602 pCMV β	18.6	$5.7(10^4)$

azith 60ug/ml at time 2 hours	SC602	0	$5.8(10^3)$
azith 60ug/ml at time 2 hours	SC602 pCMV β	27.0	$4.9(10^3)$

Mid log counts indicate the number of bacteria added to the flask. Bacteria were allowed to interact with the monolayer for 90 minutes prior to extensive washing, and addition of gentamicin. Azithromycin was added at the indicated concentration and time after the adherence/invasion step. β -galactosidase assay was performed the following day.

5

EXAMPLE 2

For this experiment, BHK cells were infected with either 15D, 15D(pCMVb), SC602 or SC602(pCMVb). Initially, the number of viable bacteria and b-galactosidase activity were determined directly after the adherence and invasion step or 24 hours later in the presence of gentamicin. These results indicate: 1) strain SC602 can adhere and invade as well as strain 15D, which requires the presence of DAP in the inoculum to obtain this level of adherence and invasion and 2) only strain 15D(pCMVb) can deliver DNA in the absence of antibiotics. With the addition of 30ug/ml azithromycin, SC602(pCMVb) can now deliver DNA with resulting b-galactosidase activity detected at a similar level to strain 15D(pCMVb) (i.e. 17.4 adn 34 units versus 13.23 and 61.64 units). Addition of azithromycin immediately after the adherence and invasion step seemed to reduce the level of delivered DNA as indicated by the lower b-galactosidase units for both 15D(pCMVb) and SC602(pCMVb). This reduction in b-galactosidase activity when azithromycin is added immediately after the adherence and invasion step can also be seen in Table 1A. These results likely indicate that the bacteria are not within the cytoplasm at the time azithromycin begins to act; therefore, the plasmid DNA is released into the vacuole.

25 Table 1B. Azithromycin-mediated bacterial plasmid DNA delivery.

Experiment	Strain	β -galactosidase activity/mg protein	Bacterial counts
Adherence/invasion (90 min)	SC602	U/mg	Bact./Flask
		1.28	$2.68(10^6)$
Adherence/invasion (90 min)	SC602(pCMV β)	0.69	$4.88(10^6)$
Adherence/invasion			

(90 min)	15D	0.62	3.65(10 ⁶)
Adherence/invasion (90 min)	15D(pCMVβ)	1.30	0.97(10 ⁶)
24 hours	SC602	1.17	0.13(10 ⁶)
24 hours	SC602(pCMVβ)	1.59	0.20(10 ⁶)
24 hours	15D	0.74	0.18(10 ⁶)
24 hours	15D(pCMVβ)	78.96	0.14(10 ⁶)

30 ug/ml azithromycin added at indicated time after adherence/invasion:

Immediately	SC602	0.79	0.19(10 ⁶)
Immediately	SC602(pCMVβ)	17.40	0.23(10 ⁶)
Immediately	15D	0.74	0.11(10 ⁶)
Immediately	15D(pCMVβ)	13.23	0.03(10 ⁶)
2 hours	SC602	0.83	0.09(10 ⁶)
2 hours	SC602(pCMVβ)	34.27	0.41(10 ⁶)
2 hours	15D	1.03	0.02(10 ⁶)
2 hours	15D(pCMVβ)	61.64	0.08(10 ⁶)

5 Bacteria were allowed to interact with the monolayer for 90 min prior to extensive washing, and addition of gentamicin. After the adherence/invasion step, 30 ug/ml of azithromycin was added immediately or 2 hours after the adherence/invasion step. β-galactosidase activity was measured the following day.

10 Results from Tables 1 A and B indicate cultured cells that have been infected with an attenuated strain of bacteria not designed to lyse on its own can be made to do so by the addition of exogenous azithromycin. Addition should be timed to allow maximum DNA delivery (i.e. approximately 2 hours post adherence and invasion). It should be noted that no dramatic decrease in the number of viable bacteria was detected after the addition of azithromycin indicating: 1) a longer exposure time to the antibiotic might be necessary to lyse

15 all of the bacteria, 2) other conditions may need to be in place to mimic true physiological conditions, or more likely 3) the level of replication in the absence of antibiotics (i.e. the 24 hour data) may not be a true reflection of the viable

bacteria if this strain is destroying the cultured cells, an observation that need to be clarified.

EXAMPLE 3

Ciprofloxacin Treatment to Mediate DNA Delivery

- 5 In these studies, strains 15D, 15D (pCMV β), SC602, and SC602 (pCMV β) were allowed to invade BHK cells cultured to semi-confluence. They were uniformly treated with gentamicin, an antibiotic that readily kills any remaining extracellular bacteria, then treated at various times with ciprofloxacin [Fass, R. (1983) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24: 568-574], a
- 10 quinolone capable of inhibiting the activity of DNA gyrases which are required to supercoil bacterial DNA [Gellert et al. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73(11): 3872-3876]. The supercoiled structure of DNA is responsible for the protection and proper functioning of the DNA. Unless supercoiled, DNA cannot transcribe properly and is also exposed to destructive nucleases and other
- 15 damaging agents found within the bacterial cell. Unlike the results described above, ciprofloxacin was unable to mediate DNA delivery (Table 2). The best explanation for these results is that ciprofloxacin inhibits the ability of DNA gyrases to supercoil the plasmid DNA; thus the plasmid DNA is not protected from nucleases during the period in which the bacterium is dying. In fact,
- 20 treatment of 15D(pCMV β) infected monolayers with ciprofloxacin just after the adherence/invasion step inhibited delivery of the plasmid DNA by this strain. This could be the result of either the bacteria not being out of the endocytic vacuole at the time of their death or as suggested above- ciprofloxacin's action on DNA gyrases affects the supercoiling of the plasmid DNA making it more
- 25 susceptible to nuclease activity. If the latter is true, the results would also suggest strain 15D has lysed and delivered the plasmid DNA by two hours after the adherence and invasion step.

Table 2. Ciprofloxacin treatment.

		β -galactosidase activity/mg of protein	Bacterial Counts
Experiment	Strain	U/mg	Bact./Flask
Midlog	15D		1.6(10 ⁶)
Midlog	15D pCMV β		1.7(10 ⁶)
Midlog	SC602		2.2(10 ⁶)
Midlog	SC602 pCMV β		1.3(10 ⁶)

90 min. adherence/invasion	15D	1.01	6.6(10 ⁵)
90 min. adherence/invasion	15D pCMVβ	1.64	6.8(10 ⁶)
90 min. adherence/invasion	SC602	0.15	2.8(10 ⁶)
90 min. adherence/invasion	SC602 pCMVβ	1.02	7.2(10 ⁶)
24hr gentamicin, no cipro.	15D pCMVβ	188.24	1.56(10 ⁴)
24hr gentamicin, no cipro.	SC602 pCMVβ	1.40	6.02(10 ⁴)
cipro. added at time 0 24hr gentamicin	15D pCMVβ	7.56	0
cipro. added at time 0 24hr gentamicin	SC602 pCMVβ	1.67	1(10 ³)
cipro. added at time 2 hours 24hr gentamicin	15D pCMVβ	131.48	0
cipro. added at time 2 hours 24hr gentamicin	SC602 pCMVβ	2.34	2(10 ²)
cipro. added at time 4 hours 24hr gentamicin	15D pCMVβ	228.20	1.2(10 ³)
cipro. added at time 4 hours 24hr gentamicin	SC602 pCMVβ	1.48	0

Midlog counts indicate the number of bacteria added to each flask. Bacteria in each experiment were allowed to interact with the monolayer for 90 minutes prior to extensive washing, followed by the addition of gentamicin (50ug/ml) or ciprofloxacin (50ug/ml) containing medium at the indicated time.

5

EXAMPLE 4

Cyclohexamide Treatment Confirms Production of the Plasmid-encoded Foreign Product is Dependent upon the Eukaryotic Cell

10 In these experiments, BHK cells were infected with 15D(pCMVβ) for 90 minutes then treated with gentamicin followed by cyclohexamide, a peptidyl transferase blocker that inhibits protein synthesis in eukaryotic cells but not in bacteria. These experiments were done to confirm translation of the plasmid-encoded β-galactosidase was dependent upon the eukaryotic cell machinery.

15 (i.e., protein synthesis was not taking place in the bacterial cell). As illustrated in Table 3, treatment of 15D(pCMVβ) infected BHK cells with cyclohexamide at various times after the adherence/invasion step resulted in the inhibition of β-galactosidase activity, yet had little (i.e., a loss of 1 log viable bacteria when treatment occurred right after to two hours after the adherence/invasion step) to

20 no effect on the number of viable bacteria recovered from treated wells. This

may be due to an active process that the bacteria requires from the cultured cell which is inhibited by the addition of cyclohexamide allowing fewer bacteria to enter.

5 Table 3. Effect of cyclohexamide on bacterial-mediated plasmid DNA delivery.

		β -galactosidase activity/mg	Bacterial Counts
Experiment	Strain	U/mg	Bact./Flask
Midlog	15D		$9.4(10^6)$
Midlog	15D p pCMV β		$1.8(10^9)$
24hrs gent	15D	1.31	$1.1(10^4)$
24hrs gent	15D pCMV β	302.5	$4.2(10^4)$
cyclohexamide at time 0	15D pCMV β	7.56	$3.8(10^3)$
cyclohexamide at time 2 hours	15D pCMV β	5.82	$4.0(10^3)$
cyclohexamide at time 4 hours	15D pCMV β	4.96	$4.5(10^4)$

Mid-log indicates the number of bacteria added per flask. Bacteria are allowed to interact with the monolayer for 90 minutes followed by washing and addition of gentamicin. Cyclohexamide is added at the indicated time after the adherence/invasion step. The β -galactosidase assay was performed the following day.

10

DISCUSSION

Azithromycin is capable of mediating bacterial-based plasmid DNA
 15 delivery by an attenuated strain of *Shigella flexneri* not programmed to lysis after entry and endocytic vacuole escape of a mammalian cell. We hypothesize azithromycin action on protein synthesis inhibits the bacterium from synthesizing many of the components required to build its cell wall during division- much like the mutation of the *asd* gene within strain 15D, which
 20 removes an enzyme required to complete the process of cell wall synthesis. Thus, the plasmid DNA leaks out of the dying bacterium into the mammalian cell cytoplasm. We hypothesize that ciprofloxacin's inability to mediate delivery is based on the drug's action on DNA gyrase. If the plasmid DNA is no longer

protected from the action of bacterial nucleases, then it will be degraded before the bacterium lyses.

5

10

15

20

25

30

What is claimed is:

1. A method for delivering functional DNA into a cell, said method comprising the steps of:

(i) introducing said functional DNA into an attenuated bacteria able to
5 enter cells;

(ii) allowing said attenuated bacteria to enter cell; and

(iii) lysing said bacteria inside said cell such that said DNA is released
into said cell.

10 2. A method for the delivery of functional DNA to a cell according to claim 1, wherein said bacteria is *Shigella*.

3. A method for the delivery of functional DNA to a cell according to claim 2 wherein said *Shigella* is SC602.

4. A method for the delivery of functional DNA to a cell according to
15 claim 1, wherein lysing of said bacteria in step (iii) is by using an antimicrobial.

5. A method for the delivery of functional DNA to cell according to claim 4, wherein said antimicrobial is an antibiotic.

6. A method for the delivery of functional DNA to a cell according to claim 5, wherein said antibiotic is azithromycin.

20 7. A method for the delivery of functional DNA to a cell according to claim 1, wherein said cell is a cell of an intestinal mucosal epithelium cell.

8. A method for delivering functional DNA to a cell according to claim 7, wherein said mucosal epithelium is intestinal mucosal epithelium.

9. A method for delivering an antigen to a cell comprising:

25 (i) introducing said antigen into an attenuated bacteria able to enter cells;

(ii) allowing said attenuated bacteria to enter cell; and

(iii) lysing said bacteria inside said cell such that said antigen is released into said cell.

10. A DNA delivery kit for the delivery of functional DNA into cells, said kit comprising attenuated *Shigella* containing said DNA, and an antimicrobial able to enter said cells and lyse said attenuated *Shigella*.

10

15

20

25

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/05704**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**IPC(6) : C12N 15/63, 15/00, 5/00; A61K 31/70; A01N 43/04
US CL : 514/44; 435/320.1, 172.3, 69.1, 325, 424/93.21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/44; 435/320.1, 172.3, 69.1, 325, 424/93.21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS, WPIDS, APS

search terms: attenuated, bacteria, DNA, shigella, live, invasive, deliver, vector, nucleic acid, polynucleotide, gene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SIZEMORE et al. Attenuated Shigella as a DNA Delivery Vehicle for DNA-Mediated Immunization. Science. 13 October 1995, Vol. 270, pages 299-302, see entire document.	1-10
Y	STAATS et al. Mucosal Immunity to Infection with Implications for Vaccine Development. Current Opinion in Immunology. 1994, Vol. 6, pages 572-583, see entire document.	1-10
Y	PASCUAL et al. Oral Bacterial Vaccine Vectors for the Delivery of Subunit and Nucleic Acid Vaccines to the Organized Lymphoid Tissue of the Intestine. Behring Institute Mitteilungen. February 1997, Vol. 98, pages 143-152, see entire document.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

B earlier document published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

**

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

**Y*

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

A

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JUNE 1998

Date of mailing of the international search report

30 JUL 1998

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

JILL D. SCHMUCK

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/05704

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DOUGAN et al. Live Bacterial Vaccines and Their Application as Carriers for Foreign Antigens. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. 1989, Vol. 33, pages 271-300, see entire document.	1-10
A	HONE et al. Vaccination Against Enteric Bacterial Diseases. Reviews of Infectious Diseases. November-December 1989, Vol. 11, No. 6, pages 853-877, see entire document.	1-10



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/74, 1/21, 15/01, A61K 39/02 //C12N 15/31 (C12N 1/21, C12R 1:01)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15212 (43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00105 (22) Date de dépôt international: 1er février 1993 (01.02.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/01128 31 janvier 1992 (31.01.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : COSSART, Pascale [FR/FR]; 101, rue de la Croix-Nivet, F-75015 Paris (FR). KOCKS, Christine [FR/FR]; 121, rue Raymond-Cosserand, F-75014 Paris (FR). GOÛSSENS, Pierre [FR/FR]; 51, boulevard de Charonne, F-75011 Paris (FR). MILON, Geneviève [FR/FR]; 26, rue Louis-Braille, F-75012 Paris (FR).		(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: ATTENUATED MUTANT OF LISTERIA MONOCYTOGENES; RECOMBINANT STRAIN OF LISTERIA MONOCYTOGENES, USE AS HETEROLOGOUS VACCINAL ANTIGENE VECTORS AND USE AS VACCINE OR DIAGNOSTIC COMPOSITION (54) Titre: MUTANT ATTENUÉ DE LISTERIA MONOCYTOGENES; SOUCHE RECOMBINANTE DE LISTERIA MONOCYTOGENES, UTILISATION COMME VECTEURS HÉTÉROLOGUES D'ANTIGÈNE VACCINAL ET UTILISATION COMME VACCIN OU COMPOSITION DIAGNOSTIQUE (57) Abstract <p>The invention discloses an attenuated mutant of <i>Listeria monocytogenes</i> incorporating in the act A gene or in its promoter a mutation capable of blocking or modifying the expression of the protein coded by the act A gene. This mutant can be used as a living vector for the expression of an heterologous ADN, particularly a gene coding for a viral, bacterial or parasitic protector antigen which is the target of T cells of subclass CD8. The recombinant mutant strains thus obtained may be used as a vaccine or diagnostic composition for checking the protection state of a host.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet un mutant atténué de <i>Listeria monocytogenes</i> comportant dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci une mutation apte à bloquer ou modifier l'expression de la protéine codée par le gène act A. Ce mutant peut être utilisé en tant que vecteur vivant pour l'expression d'un ADN hétérologue, notamment d'un gène codant pour un antigène viral, bactérien ou parasitaire protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8. Les souches mutantes recombinantes ainsi obtenues ont des applications en tant que vaccin ou composition de diagnostic pour le contrôle de l'état de protection d'un hôte.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BE	Belgium	GN	Guinea	NO	Norway
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	HU	Hungary	PL	Poland
BJ	Benin	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SK	Slovak Republic
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Germany	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Denmark	ML	Mali	US	United States of America
ES	Spain	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
FI	Finland				

1

Mutant atténué de Listeria monocytogènes; souche recombinante de Listeria monocytogènes, utilisation comme vecteurs hétérologues d'antigène vaccinal et utilisation comme vaccin ou composition diagnostique

La présente invention concerne une souche mutante atténuée de Listeria monocytogenes et ses applications immuno-thérapeutiques et diagnostiques, notamment pour la fabrication d'une souche recombinante utilisable en tant que vaccin.

Listeria monocytogenes est un bacille aérobie facultatif, non sporulant, à gram-positif très répandu dans l'environnement et responsable de la listériose humaine et animale. La maladie se manifeste par des infections opportunistes, soit par une méningite et/ou encephalite, des septicémies ou par des avortements, avec un taux de mortalité élevé chez les nouveau-nés et les adultes dont les mécanismes de défense sont affaiblis par la grossesse, une immunosuppression thérapeutiquement induite, une maladie sous-jacente ou la vieillesse. La listériose peut aussi atteindre des sujets apparemment sains.

Listeria monocytogenes est capable in vivo comme in vitro d'infecter une grande variété de types cellulaires, notamment les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les entérocytes.

Après sa pénétration dans la cellule infectée, la bactérie lyse la membrane du phagosome grâce à une hémolysine qu'elle sécrète. Au terme de cette étape, la bactérie est dans le cytoplasme de la cellule hôte.

En outre, Listeria monocytogenes se caractérise par son aptitude à se propager dans les tissus par infection directe de cellule à cellule sans quitter le cytoplasme (Racz et al., 1970 (9)).

Peu de temps après son entrée dans la cellule hôte, la bactérie s'entoure d'actine filamenteuse (actine F) qui est ultérieurement se réarrange en "comète" derrière la bactérie dans la direction opposée au mouve-

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ment (Tilney et al., 1989, (13); Mounier et al., (1990) (1). L'actine polymérisée est constituée de microfilaments courts, orientés au hasard qui diffèrent des filaments d'actine longs habituellement observés dans les cellules musculaires.

Les bactéries sont mobiles et laissent derrière elles des "comètes" d'actine F de plusieurs µm de longueur. Certaines sont incorporées dans des protubérances cytoplasmiques en forme de doigt, qui peuvent être internalisées par les cellules voisines. Les deux membranes plasmiques entourant la bactérie sont alors lysées. Une fois dans le cytoplasme de la nouvelle cellule hôte, la bactérie peut se reproduire et commencer un nouveau cycle de dissémination.

Pendant ce processus de dissémination, les cellules de Listeria monocytogenes sont protégées du système immunitaire de l'hôte, et la dissémination de cellule à cellule représente par conséquent un facteur clé de virulence.

En isolant et analysant un mutant Tn 917-Lac inapte à se disséminer de cellule à cellule, les inventeurs ont pu identifier une protéine de Listeria monocytogenes impliquée dans l'assemblage de l'actine induit par la bactérie.

Le gène codant pour cette protéine dénommée act A, fait partie d'un opéron (Mengaud et al., 1991 (b) (8)) dont la séquence nucléotidique complète a été récemment décrite (Vazquez-Boland et al., 1992 (12)).

La présente invention a ainsi pour objet une souche de Listeria monocytogenes à virulence atténuée, caractérisée en ce qu'elle comporte, dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci, une mutation capable de bloquer ou de modifier sensiblement l'expression de la protéine codée par le gène act A.

La mutation peut être réalisée selon les

techniques connues, notamment par insertion dans le gène act A ou son promoteur, d'une séquence d'une ou plusieurs bases, de préférence un transposon stable, délétion d'une ou plusieurs bases, mutations telles que mutations par mutagenèse dirigée, par exemple par PCR et notamment mutations faux-sens.

La mutation peut notamment être réalisée par insertion d'un transposon, tel que le transposon Tn 917-lac, comme décrit par Mengaud et al., 1991 (a) (7).

La mutation est effectuée de préférence dans le fragment d'ADN codant pour la séquence peptidique à motifs répétés comprise entre les aminoacides 235 à 315, 350 à 360, 367 à 385 et 389 à 393 de la séquence peptidique SEQ ID N° 1.

Un autre site de mutation avantageux, notamment d'insertion est situé en aval de l'adénosine en position 497 de la séquence nucléotidique du gène act A.

Cette position correspond à celle entre les aminoacides 61 et 62 de la séquence peptidique SEQ ID N° 1.

Une souche particulièrement préférée selon la présente invention est la souche de la Listeria monocytogenes LUT 12 déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 30 janvier 1992 sous le numéro I-1167.

Les mutants selon l'invention sont aptes à conférer à des hôtes auxquels ils ont été administrés une protection contre une infection ultérieure par une souche pathogène de Listeria monocytogenes.

L'invention a donc également pour objet un vaccin humain ou vétérinaire comprenant en tant que composant actif une souche atténuée de Listeria monocytogenes, telle que définie précédemment.

Ce vaccin est apte à conférer une protection efficace à l'homme ou à l'animal notamment aux bovins et

ovins contre la listériose.

La réponse immunitaire générée par l'administration d'un mutant atténué tel que défini se traduit par la prolifération essentiellement de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

Les lymphocytes T de la sous-classe CD8 sont activés par des peptides liés à des antigènes de classe I du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) générés par la protéolyse de protéines synthétisées ou libérées dans le cytoplasme d'une cellule présentant l'antigène.

Ainsi, les mutants atténués de Listeria monocytogenes selon l'invention, sont aptes à stimuler le système immunitaire par la voie qui utilise les molécules de classe I du CMH.

Il est par conséquent possible en transformant Listeria monocytogenes à l'aide d'un plasmide approprié d'introduire un gène hétérologue provenant de n'importe quel organisme et d'utiliser les souches recombinantes obtenues comme système d'expression d'ADN hétérologue.

L'invention a ainsi également pour objet un mutant recombinant de Listeria monocytogenes caractérisé en ce qu'il comporte un ADN hétérologue, soit inséré dans le génome d'un mutant atténué tel que défini précédemment, soit porté par un plasmide se répliquant dans le mutant atténué.

L'ADN hétérologue consiste de préférence en un gène hétérologue codant pour un antigène protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

Cet antigène peut être d'origine bactérienne (par exemple de mycobactéries), parasitaire, (par exemple de Leishmania, Tripanosoma ou Toxoplasma) ou viral (virus de la grippe, virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ou virus du Sida (VIH)).

Un mutant recombinant de Listeria monocytog-

nes particulièrement intéressant comporte les gènes codant pour l'antigène gag et/ou l'antigène nef du VIH ou tout ou partie de l'enveloppe gp 120 du VIH 1 ou gp 140 du VIH 2 ou par un peptide tel que défini dans US-4 943 628.

La construction du mutant recombinant peut être réalisée par transformation d'un mutant atténué tel que défini ci-dessus, notamment du mutant LUT 12 à l'aide d'un plasmide approprié, et par exemple électroporation.

Avantageusement, le clonage de l'ADN hétérologue sera réalisé chez E. Coli et on utilisera un plasmide navette E. Coli - Listeria monocytogenes pour réaliser la transformation.

Comme plasmides, on peut citer pMKA 4 (Sullivan et al., (14)) ou PHT 320 (Leredus et al., (15)).

Pour permettre l'expression du gène d'intérêt (gène hétérologue), il est avantageux d'insérer en amont du gène d'intérêt un promoteur fort de *Listeria*, tel que le promoteur hly.

Pour que le produit de traduction du gène d'intérêt puisse être sécrété, il est préférable de fusionner le gène d'intérêt au début de hly afin d'utiliser "la séquence signal" de la listériolysine O pour libérer la protéine d'intérêt codée par le gène hétérologue dans le cytoplasme d'une cellule d'hôte.

Les mutants recombinants de Listeria monocytogenes tels que définis ci-dessus conviennent de manière avantageuse pour la préparation d'un vaccin recombinant humain ou vétérinaire, contre une infection provoquée par un microorganisme produisant un antigène correspondant à la protéine codée par l'ADN hétérologue inséré dans le génome de Listeria monocytogenes recombinant.

Les vaccins selon l'invention peuvent être administrés par voie intra-veineuse, sous-cutanée, intramusculaire ou orale.

Une dose appropriée se situe entre 5.10^4 et 10^9 cellules/kg de poids.

Cette dose varie en fonction de la voie d'administration ainsi que de la sensibilité de l'hôte.

5 L'administration est de préférence répétée afin de conférer une protection efficace à l'hôte.

Les mutants recombinants de Listeria monocytogenes définis ci-dessus sont également appropriés à la préparation d'une composition de diagnostic destinée au
10 contrôle de l'état de protection d'un hôte humain ou animal contre une infection provoquée par un microorganisme produisant un antigène correspondant à la protéine codée par l'ADN hétérologue inséré dans le génome de Listeria monocytogenes recombinant ou exprimé dans cette
15 souche lorsque porté par un plasmide.

Il suffira d'injecter localement la composition de diagnostic selon l'invention par voie sous-cutanée par exemple et d'observer après un certain temps de latence si une réaction inflammatoire a lieu ou non,
20 à la manière du test à la tuberculine utilisé pour contrôler l'état de protection d'un hôte contre le bacille de la tuberculose.

On décrira ci-après l'obtention de la souche mutante LUT 12 de Listeria monocytogenes ainsi que ses propriétés en se référant à la fig. annexée représentant:
25

A : l'opéron lécithinase de Listeria monocytogenes (Vasquez - Boland et al., 1992 (12) avec la position du transposon dans le mutant LUT 12.
30

B : la séquence d'acides aminés de la protéine codée par le gène act A.

Les traits noirs renforcés représentent des gènes dont les produits ont été caractérisés (mpl : metalloprotéase, Domann et al., 1991, (3) act A : (présente invention), plc B : lécithinase) ORFX, ORFY et ORFZ sont des cadres de lecture ouverte.

P : indique le promoteur, les lignes en pointillées le produit de transcription et un signal de terminaison de transcription potentiel.

La séquence signal potentielle et le segment transmembranaire sont soulignés. La région de motifs répétés est entourée. La flèche correspond à l'insertion de Tn 917-lac dans le gène actA du mutant LUT 12.

La numérotation débute à l'extrémité NH₂ de la protéine mature. Les résidus déterminés par microséquençage de la bande de 90 kDa sont imprimés en caractères gras et marqués par un astérisque.

I - Techniques générales de clonage et d'analyse d'ADN

Toutes les techniques de clonage et d'analyse ont été effectuées conformément aux protocoles standards (Sambrook et al. 1989 (10)) ou suivant les instructions du fabricant.

1'ADN chromosomique de Listeria monocytogenes a été préparé comme décrit par Mengaud et al., 1991 (b) (8). Les sondes pour Southern blot ont été préparées par PCR, purifiées à partir des gels d'agarose en utilisant le kit Geneclean (Bio 101, Inc, La Jolla, CA), et marquées en utilisant le système Multiprime d'Amersham.

Les hybridations selon Southern ont été réalisées à l'aide du système d'hybridation rapide (Amersham) sur des membranes de Nylon N (Amersham) dans un four pour hybridation Hybaid.

II - Isolement de la souche LUT 12 et détermination du point d'insertion du transposon

Une banque de mutants Tn 917-lac, produits à partir de la souche de type sauvage L028 et du plasmide p TV32 portant le transposon Tn 917-Lac comme décrit par Mengaud et al., 1991 a (7), a été criblée sur des plaques de gélose au jaune d'oeuf préparée à partir de jaune d'oeuf frais dilué au 1:2 dans une solution de NaCl 150 mM, et d'addition de 12,5 ml de ce mélange à 250 ml de gélose additionnée d'une infusion de cerveau et de coeur (BHI) à 56°C.

Un mutant lécithinase-négatif ne produisant pas d'opacification du jaune d'oeuf même après une incubation prolongée et montrant un phénotype de type sauvage pour tous les autres caractères examinés a été appelée LUT 12.

A - Caractéristiques biologiques de ce mutant

Ce mutant avait à la fois une activité hémolytique et un taux de croissance in vitro identiques au type sauvage, mais se révélait de virulence très atténuée chez la souris.

TOXICITE

La DL_{50} était plus élevée d'un facteur 4 log 10 que la DL_{50} des bactéries du type sauvage ($10^{8.55}$ bactéries au lieu de $10^{4.25}$).

TESTS DE FORMATION DE PLAGES SUR CULTURES DE FIBROBLASTES

Des essais ont été effectués sur des fibroblastes 3T3 (ECA CC88031146). selon la technique décrite par Kuhn et al., 1990 (5), sauf que les infections étaient réalisées à des concentrations variées d'inoculum : 1 à 25 μ l de sous-cultures bactériennes de 2 heures (A_{600nm} de 0,45) soit non diluées soit diluées au 1/10.

Cet essai révèle l'aptitude de Listeria monocytogenes à se multiplier de manière intracellulaire et à se disséminer sur des couches simples de fibroblastes revêtues d'une couche de gélose contenant de la gentamicine à une concentration létale pour les bactéries extracellulaires mais non pour les bactéries intracellulaires. Après plusieurs jours, des zones de cellules mortes détruites par l'infection bactérienne sont visibles à l'oeil nu sous forme de "plages".

Les bactéries LUT 12 mutantes étaient inaptes à former des plages sur des couches simples de fibroblastes 3T3.

ESSAI DE DISSEMINATION SUR DES MACROPHAGES DE MOELLE OSSEUSE

Une observation au microscope optique de la dissémination de Listeria monocytogenes sur des couches simples de macrophages primaires de moelle osseuse a en outre été réalisée comme suit.

Des suspensions contenant des macrophages ont été préparées à partir de moelle osseuse d'une souris femelle C57BL/6 âgée de 7 semaines, et cultivées dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum foetal de veau en présence de surnageant L. 4.10⁵ macrophages dérivés de moelle osseuse obtenus au jour 6 ont été ensemencés dans les lamelles en verre rondes (diamètre 12 mm) la veille de l'utilisation. Les macrophages ont été infectés avec une MI (multiplicite d'infection) de 0,04 (une bactérie pour 25 macrophages, résultant en à peu près 1% de cellules infectées), de manière à pouvoir observer des points individuels d'infection, générés par la progéniture d'une seule bactérie. L'infection a été réalisée comme décrit pour un macrophage J774.

Après 30 minutes et après 8 heures, ces monocouches cellulaires ont été fixées et colorées avec une solution de Giemsa.

Après 8 heures, la progéniture des bactéries de type sauvage s'était disséminée à de nombreuses cellules hôtes nouvelles, et des bactéries portant des protubérances à leur extrémité pouvaient être observées.

5 Au contraire, la progéniture du mutant LUT 12 est restée enfermée à l'intérieur d'une seule cellule infectée. Les bactéries mutantes ont, soit formé des microcolonies ou étaient disséminées dans le cytoplasme des cellules hôtes, mais aucune protubérance contenant des bactéries
10 ne pouvait être détectée.

Ce résultat indique que la bactérie mutante se multiplie à l'intérieur des cellules infectées, mais est incapable d'infecter des cellules adjacentes par dissémination de cellule à cellule.

15 TEST DE CROISSANCE SUR DES MACROPHAGES J774

Un essai démontrant que la bactérie mutante LUT 12 était apte à se multiplier de manière intracellulaire a été réalisé au moyen d'un test de croissance sur des macrophages J774.

20 Cet essai a été réalisé sur des couches simples de J774 dans des flacons de culture de tissus en matière plastique de 25 cm³. Les cellules étaient infectées avec une MDI de 10 bactéries par cellule. Le nombre de bactéries intracellulaires était calculé après
25 2, 6 et 10 heures de croissance sur un milieu contenant de la gentamicine (5 µg/ml) par lyse des mono-couches cellulaires, lavage avec de l'eau distillée froide et étalement de dilutions appropriées sur des plaques contenant un milieu BHI.

30 Après une durée de 10 heures, les courbes de croissance des bactéries de type sauvage et LUT 12 étaient identiques.

OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Le comportement intracellulaire du mutant LUT
35 12 a été observé au microscope électronique. Des macro-

phages J774 étaient infectés avec des bactéries de type sauvage ou la souche mutante pendant 30 minutes, suivie par une incubation de 60 à 210 minutes dans un milieu contenant la gentamicine. Pour le mutant et le type sauvage, on pouvait observer des bactéries libres dans le cytoplasme à 1 h 1/2 d'infection. A ce moment, le type sauvage et le mutant étaient entourés par une couche mince de matériel granulaire crépelé, mais seul le type sauvage comportait du matériel filamentaire assemblé à sa surface, constitué de filaments d'actine. A 4 h après l'infection, les bactéries de type sauvage étaient entourées par d'épaisses couches de filaments d'actine F. Au contraire, les bactéries mutantes LUT 12 étaient presque nues. Même le revêtement fin crépelé observé au moment précoce de l'infection avait disparu.

Pour visualiser l'association d'actine F bactérienne de manière spécifique, les auteurs ont réalisé des colorations en double fluorescence à l'aide de FITC-phalloïdine, une toxine fongique se liant à l'actine F, et avec un sérum anti-L.monocytogenes, suivi par un second anti-corps couplé à la rhodamine, pour détecter les bactéries. Les macrophages J774 étaient infectés depuis 4h avec les bactéries de type sauvage ou mutant. Tandis que les bactéries de type sauvage se coloraient positivement avec la FITC-phalloïdine, les bactéries mutantes LUT 12, bien que détectables avec le sérum anti-L.monocytogenes restaient invisibles avec la coloration de l'actine.

Ces résultats démontrent que les bactéries LUT 12 s'échappent des phagosomes aussi efficacement que les bactéries de type sauvage et se multiplient dans le cytoplasme. Cependant, les bactéries mutantes ne sont jamais associées avec de l'actine F, sont incapables de se déplacer à l'intérieur de la cellule, et ne peuvent infecter des cellules voisines par dissémination directe.

Ces observations suggèrent que le mutant LUT 12 est déficient en un composant nécessaire pour le procédé de formation de filaments d'actine induit par Listeria monocytogenes.

5 B - DETERMINATION DU POINT D'INSERTION DU TRANSPONON

Ce mutant a été analysé par Southern blot pour déterminer le nombre de transposons insérés dans son chromosome.

10 L'ADN chromosomique a été digéré par Bam HI, Eco RI, Hind III, Kpn I et Pst I.

On a utilisé deux sondes différentes correspondant à Tn 917-lac (Shaw et Clewell, 1985 (11)): une sonde recouvrant 515 paires de bases du gène de résistance à l'érythromycine, obtenue par PCR avec les
15 oligonucléotides 5'-TTG GAA CAG GTA AAG GGC ATT TAA-3' (position 821 à 844) et 5'-AGT AAA CAG TTG ACG ATA TTC TCG-3' (position 1313 à 1336), et une sonde recouvrant le fragment interne Hind III du transposon obtenue par PCR avec les oligonucléotides 5'-ACA ATT AAT GTC TCC CAT
20 ATT-3' (position 3082 à 3102) et 5'(ACT GAT AAT TAA CCA AAA CAG-3' (position 4295-4315).

La jonction transposon-chromosome a été clonée à partir d'une banque d'ADN chromosomique obtenue par restriction avec Eco RI/Kpn I dans pUC 18. Un clone
25 comportant un segment d'insertion, correspondant à la jonction chromosome-transposon a été isolé et séquencé directement à partir du plasmide par utilisation d'un oligonucléotide s'hybridant avec l'extrémité droite du transposon (5'-CTA AAC ACT TAA GAG AAT TG-3', position
30 5244 à 5263).

Le transposon était inséré après l'adénine 497 dans la séquence nucléotidique du fragment Hind III -

Eco RI du gène act A de l'opéron identifié par Mengaud et al., 1991 (b) (8), dont la séquence nucléotidique a
35 été décrite par Vazquez-Boland et al., 1992 (12).

Le point d'insertion du transposon Tn 917-lac est représenté sur le schéma de la fig. (A).

Le phénotype lecithinase-négatif du mutant LUT 12 est vraisemblablement dû à un effet polaire de la mutation par insertion dans act A, dans la mesure où le 3ème gène de l'opéron plcB code pour la lecithinase.

Des études complémentaires ont été réalisées qui ont démontré que la perte de l'activité de polymérisation de l'actine était bien due à une perte d'expression du gène Act A.

Des mutants ont été réalisés par recombinaison homologue entre le chromosome de Listeria monocytogenes et des fragments correspondant à des parties du gène plcB et des cadres de lecture ouverte ORFX/Y et ORFZ (fig. (A)) situés en aval du gène act A par insertion de plasmides en divers sites.

Des études d'immunofluorescence par utilisation de FITC-phalloïdine et marquage à la rhodamine de bactéries dans des macrophages J 774 infectés ont montré que les mutants plcB, ORFX/Y et ORFZ étaient associés à des filaments d'actine F tout comme les bactéries de type sauvage. Ces études ont été complétées par des études de microscopie électronique qui ont montré que ces mutants étaient aptes à stimuler l'assemblage de l'actine de la même manière que le type sauvage.

Ces analyses montrent par conséquent que des mutations en aval de act A n'affectent pas l'assemblage de l'actine A et suggèrent que l'incapacité du mutant LUT 12 à polymériser l'actine cellulaire est due à l'absence d'expression du gène act A.

Une transformation du mutant LUT 12 réalisée avec act A montre par ailleurs que le phénotype de type sauvage est restauré, ce qui exclut la possibilité d'une mutation spontanée en un autre site du chromosome.

Ces résultats démontrent ainsi que le produit

du gène act A est nécessaire pour l'assemblage de l'actine de Listeria monocytogenes et par conséquent pour son pouvoir pathogène.

Le produit du gène act A a été déterminé
5 comme décrit ci-après :

III - Analyse du produit du gène act A

La séquence nucléotidique du gène act A
10 laisse supposer que celui-ci code pour une protéine de 639 aminoacides avec une séquence signal et une région transmembranaire (Vazquez Boland et al., 1992 12()).

Des études complémentaires ont été réalisées d'une part par analyse comparée des protéines de surface
15 de Listeria monocytogenes de type sauvage et de la souche LUT 12.

Les isolats bactériens ont été cultivés dans 200 ml de bouillon d'infusion cerveau-coeur (BHI, Laboratoires DIFCO, Detroit, Michigan) additionné
20 d'érythromycine à 5 µg/ml pour LUT 12, sous agitation à 160 tpm sur un agitateur Gyrotory G10 (New Brunswick Scientific) à 37° C pendant 18 h.

Les bactéries ont été récoltées par centrifugation (5000 g pendant 20 minutes) et lavées à trois
25 reprises dans une solution saline de tampon phosphate (PBS).

Le culot obtenu a été remis en suspension dans 4 ml de PBS et du SDS a été ajouté à une concentration finale de 1 %. A cette concentration de SDS, les
30 cellules de L. monocytogenes ne se lysent pas. L'absence de lyse bactérienne a été vérifiée au microscope. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, les bactéries ont été centrifugées (50.000 g pendant 10 minutes) et le surnageant concentré par ultrafiltration
35 sur des microconcentrateurs (Centricom 30, Amicon) et

conservé à -20° C.

La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (Pierce). La concentration en protéines a été ajustée à 300 µg/ml pour l'électrophorèse. 10 µl d'extrait ont été mélangés avec 10 µl de tampon (SDS à 2 %, glycérol à 10 %, mercaptoéthanol à 5 %, bleu de bromophénol à 0,002 % et Tris HCl 0,02 M), bouillis pendant 3 minutes à 100° C. L'électrophorèse a été effectuée à 60 mA pendant 120 minutes à travers des gels discontinus de polyacrylamide (Laemmli, 1970 (6)). les bandes ont été visualisées par coloration à l'argent (Heukeshoven et Dernick, 1985 (4)).

Pour le marquage de la surface cellulaire, on a centrifugé 400 ml d'une culture de 18 heures de L. monocytogenes; les bactéries ont été lavées à 3 reprises avec PBS à pH 7,4 et remises en suspension dans 8 ml de PBS PH 8,0 à 4° C.

Les bactéries ont ensuite été traitées avec de la sulfosuccinimido biotine (sulfo-NHS-biotine; Pierce) à une concentration finale de 0,5 mg/ml pendant 2 minutes sous agitation modérée.

Les cellules ont été lavées à trois reprises avec PBS à pH 7,4 et extraites par extraction au SDS.

Les extraits correspondant à 7 µg de protéines par couloir ont été déposés sur des gels SDS et transférés comme décrit par De Rycke et al., 1989 (2) sur nitrocellulose (BA 85, Schleicher et Schüll. Les filters de nitrocellulose ont été saturés pendant une nuit dans PBS à 0,5 % de gélatine et incubés pendant 1,5 heure avec de la streptavidine conjuguée à de la peroxydase (Jackson) dans du PBS contenant 0,5 % de gélatine et 0,1 M de Tween 20. Après différents lavages dans le même tampon, les bandes réactives ont été révélées avec 0,5 mg/ml de 4-chloro-1-naphtol (Biorad) et 0,03 % v/v d'H₂O₂ dans l'eau.

Les analyses des gels d'électrophorèse montrent un bande de 90 kDa pour le type sauvage qui est absente chez la souche LUT 12. Cette bande est également retrouvée chez les mutants plcB et les mutants LUT 12 transformés par act A mentionnés ci-dessus.

Les analyses de marquage de surface par la sulfosuccinimido-biotine montrent de façon directe une protéine biotinylée de 90 kA chez les bactéries du type sauvage qui est absente chez la souche mutante LUT 12.

Pour identifier sans ambiguïté la protéine 90 kDa, la bande de 90 kDa a été isolée et la séquence des 6 aminoacides de l'extrémité NH₂ a été déterminée et comparée avec la séquence d'acides aminés déduite de la séquence nucléotidique du gène act A.

Les extraits sur SDS correspondant à 100 µg de protéines par canal ont été mis à bouillir dans un tampon d'échantillonnage SDS contenant 7 % (p/v) d'urée avant de réaliser une électrophorèse sur des gels au SDS à 7,5 %.

Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane Problott (Applied Biosystems) dans du Tris 50 mM - borate 50 mM pendant 17 heures à 4 à 5 volts/cm. Les protéines ont été colorées pendant 5 secondes à l'aide de noir amido à 0,1 % dans une solution d'acide acétique à 1 % et de méthanol à 40 %, et rincées soigneusement à l'eau. Une bande de 90 kDa a été découpée dans plusieurs couloirs. Les protéines de la membrane ont été séquencées par dégradation selon Edman dans un séquenceur 740 A d'Applied Biosystems, avec, en ligne un analyseur HPLC PTH 120 A programmé par le fabricant pour la membrane Problott. Les séquences d'acides aminés ont été analysées sur un ordinateur Data General MV 10000 à l'Unité d'Informatique Scientifique de l'Institut Pasteur.

La séquence Ala-Thr-Asp-Ser-Glu-Asp de la

protéine isolée correspond exactement aux amino-acides du site de clivage de la séquence signal de prédite d'après la séquence peptidique-prédite à partir du gène act A (fig. B).

5 Par conséquent, le produit mature du gène act A est une protéine de 610 aminoacides avec un poids moléculaire calculé de 67 kDA. Elle a un poids moléculaire apparent de 90 kDA et est exprimée à la surface de la bactérie.

10 Cette protéine est nécessaire à l'assemblage de l'actine F et son absence conduit à une atténuation très importante de la virulence de Listeria monocytogenes. Par conséquent, toute mutation affectant le gène act A ou son promoteur et modifiant sensiblement ou empêchant
15 l'expression de son produit permettra l'obtention d'une souche atténuée non pathogène conformément à l'invention.

On rapportera ci-après les résultats obtenus in vivo avec la souche LUT 12 sur la protection de souris contre une infection par Listeria monocytogenes.

20

IV - Effets, in vivo, de la souche LUT 12 : étude chez la souris

A/ Multiplication du mutant actA dans le foie et la rate de souris infectées.

25 Le comportement de LUT 12 a été étudié, après injection intraveineuse, dans la rate et le foie de souris, qui sont les principaux organes cibles où L. monocytogenes de type sauvage expriment leur pathogénicité. Les essais cliniques utilisés étaient les sui-
30 vants : les foies et rates des souris infectées étaient récoltés à différents moments après l'infection, et homogénéisés pour permettre la libération de bactéries, et les bactéries vivantes étaient comptées in vitro.

35 La DL₅₀ du mutant actA LUT 12, après injection intraveineuse chez des souris C3H de lignée pure était

plus élevée d'un facteur $3 \log_{10}$ que celle de Listeria monocytogenes de type sauvage ($2,5 \times 10^7$ contre $2,5 \times 10^4$).

Les cinétiques de croissance du mutant actA et de la souche virulente de type sauvage dans le foie et la rate ont été comparées. Après injection intraveineuse d'une dose maximum sub létale du mutant actA ($1,5 \times 10^7$ organismes) ou de deux doses différentes de L. monocytogenes virulentes (7×10^3 ou 6×10^4), le nombre de bactéries dans le foie et dans la rate des souris infectées a été déterminé à des durées variables au cours de l'infection.

Une augmentation du nombre de mutant actA a été observée dans la rate pendant les 24 premières heures, mais cette augmentation était limitée ($1 \log_{10}$) en comparaison avec l'augmentation d'un facteur $4 \log_{10}$ observée avec la souche de type sauvage. A partir du jour 1, le nombre de bactéries mutantes actA a rapidement diminué et au jour 5, presque aucune bactérie ne pouvait être récoltée à partir de la rate. Au contraire, la souche sauvage de Listeria monocytogenes pouvait toujours être détectée dans cet organe aux jours 9 à 10 de l'infection. Dans le foie, le nombre de bactéries mutantes actA a persisté à un niveau stable jusqu'au jour 4, et après cela a diminué rapidement ; au contraire, le nombre de Listeria monocytogenes de type sauvage a augmenté d'un facteur de $2 \log_{10}$ avant d'atteindre un plateau pendant 6 à 7 jours.

La persistance du mutant actA à un niveau stable pendant 4 jours dans le foie peut refléter soit un équilibre entre la multiplication bactérienne et la mort bactérienne, ou une survie des bactéries sans multiplication. Pour faire la différence entre ces deux possibilités, les courbes de croissance bactérienne dans le foie et dans la rate de souris traitées par l'ampicil-

line ont été comparées à celles de souris témoins. L'ampicilline inhibe la synthèse du peptidoglycane et est bactéricide sur des bactéries en phase de multiplication active. Les souris infectées ont été traitées à deux reprises avec 15 mg d'ampicilline par voie intrapéritonéale à partir du jour 1, 2 ou 3 de l'infection ; le foie et la rate ont été prélevés un jour plus tard, et le nombre de bactéries restantes a été déterminé et comparé avec celui obtenu à partir de souris non traitées par l'antibiotique.

Après un tel traitement, le nombre de bactéries actA a diminué brutalement dans la rate au jour 2, et dans le foie aux jours 2 et 3, mais aucune différence entre la courbe de croissance témoin n'a été trouvée aux jours 3 et 4 dans la rate, ou au jour 4 dans le foie.

Ces résultats suggèrent que la persistance du mutant actA dans le foie est due à un équilibre entre la multiplication bactérienne et la mort. Etant donné que les mutants actA sont déficients en ce qui concerne la dissémination de cellule à cellule, in vitro, la persistance de actA dans le foie est vraisemblablement due à une infection de cellules voisines après lyse des premières cellules hôtes infectées ; par conséquent, Listeria monocytogenes peut être exposée à des effecteurs bactéricides présents dans un milieu extracellulaire et sa capacité de dissémination locale peut être diminuée.

En outre, si des Listeria monocytogenes extra-cellulaires sont phagocytées par des macrophages activés par l'interféron γ , elles peuvent être incapables d'atteindre le cytosol et de poursuivre leur cycle intracellulaire.

Finalement, les mutants actA ont été éliminés de la rate et du foie plus tôt que la souche de type sauvage, suggérant que les effecteurs protecteurs de

l'hôte sont rapidement induits chez la souris infectée avec le mutant actA.

B/ Effets d'une infection unique avec le mutant actA sur l'induction d'une immunité persistante.

L'existence d'une résistance non spécifique due à l'activation des macrophages est un phénomène bien connu, survenant rapidement et de manière transitoire chez des souris "récupérant" d'une infection sublétales.

Dans le but d'éviter de détecter simultanément des effets de l'immunité non spécifique et spécifique, les inventeurs ont déterminé à quel moment la résistance non spécifique cessait de s'exprimer.

Ils ont injecté par voie intraveineuse un pathogène intra-cellulaire non apparenté, Yersinia enterocolitica Ye8081 O:8 (16,17) soit chez des souris naïves, soit chez des souris infectées avec le mutant actA, 4, 6,5, et 8,5 semaines avant l'injection. Ils ont comparé le nombre de bactéries dans la rate et dans le foie dans ces deux groupes de souris. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes à chaque moment du test. Ils ont alors réalisé les expériences suivantes, 6 semaines ou plus après l'infection avec le mutant actA.

Premièrement, la DL_{50} de L. monocytogenes de type sauvage a été déterminée chez des souris infectées 6 semaines auparavant avec le mutant actA, et chez des souris témoins : une différence d'un ordre de 100 a été observée entre les deux groupes ($2,2 \times 10^6$ et $2,5 \times 10^4$ respectivement).

Deuxièmement, les courbes de croissance de L. monocytogenes de type sauvage ont été comparées dans le foie et la rate de souris naïves et de souris immunisées depuis 6 semaines, ce pendant les 3 premiers jours de l'infection. Un ralentissement significatif de la croissance bactérienne a été observé à partir du jour 1 dans la rate, et à partir des jours 2 à 3 dans le foie.

Troisièmement, cette inhibition spécifique de la croissance de L. monocytogenes de type sauvage était encore efficace 8,5 semaines après l'infection avec le mutant actA (diminution de 4,01 log₁₀ dans la numération bactérienne de la rate 48 heures après un inoculum bactérien de 5 x 10⁴).

Ces résultats montrent qu'une infection unique avec le mutant actA atténué est suffisante pour induire une immunité contre L. monocytogenes de type sauvage.

C/ Génération de lymphocytes T CD8⁺ protecteurs contre Listeria.

Un transfert de protection a été effectué chez des "récepteurs" syngéniques naifs en utilisant des cellules de rate récoltées 7 jours après une injection intra-veineuse de 1,5 x 10⁷ bactéries mutantes actA. Les "récepteurs" ont été exposés à une infection intraveineuse avec une dose létale de L. monocytogenes de type sauvage pendant 1 heure, et le nombre de bactéries a été déterminé dans le foie et dans la rate des "récepteurs" deux jours après l'infection.

Premièrement, l'injection de splénocytes de souris infectées avec le mutant actA a provoqué une diminution importante du nombre de L. monocytogenes de type sauvage récoltées à partir de la rate des "récepteurs" ayant reçu les cellules, et cet effet était dose-dépendant. La diminution du nombre de bactéries a également été observée dans le foie des "récepteurs", mais à un degré moindre (diminution de 1,00 ± 0,45 log₁₀, n = 4, pour des transferts de 5 x 10⁷ à 2,5 x 10⁸ cellules, P < 0,02).

Dans le but de caractériser le phénotype des cellules de rate protectrices, on a soustrait dans la population cellulaire splénique immunitaire, soit des

lymphocytes Thy-1', soit CD4', soit CD8', avant le transfert passif (Tableau 1 ci-dessous). Le transfert des splénocytes non soustraits a résulté en une réduction de 3 à 4 \log_{10} du nombre de bactéries dans la rate. Cette protection était transférée par les lymphocytes T, car une déplétion en lymphocytes Thy-1' a aboli la diminution de la charge des bactéries dans la rate. Le niveau élevé de protection conférée par des splénocytes immuns après 7 jours n'était que peu affecté par la déplétion de la sous-population CD4. La majorité de l'effet protecteur conféré par les splénocytes immuns après 7 jours était sensible à une déplétion de la sous-population de CD8, mais ne pouvait pas être mis sur le compte uniquement de la sous-population de lymphocytes CD8'.

Dans la mesure où la déplétion en Thy-1 a supprimé la protection, et où la déplétion en CD4 n'a eu qu'un effet marginal, on peut considérer qu'une partie du rôle protecteur non CD8 dépendant est due aux lymphocytes T doublement négatifs, comme cela a déjà été observé par DUNN et NORTH (18). Des expériences publiées auparavant de déplétion/protection sur des cellules lymphoïdes isolées de souris récupérant d'une infection avec L. monocytogenes de type sauvage ont montré que L. monocytogenes de type sauvage était capable d'induire une protection qui était presque exclusivement due à des lymphocytes CD8', et que ces lymphocytes CD8' protégeaient sans la participation de lymphocytes CD4'.

Le mutant actA de L. monocytogenes est ainsi capable d'induire la génération de lymphocytes CD8' spécifiques, protégeant contre Listeria.

Le mutant actA possède un gène de la listériolysine-O fonctionnel qui lui permet de s'échapper du phagosome et d'entrer dans le cytosol ; il est probable que le mutant actA est capable de stimuler la production de lymphocytes T CD8' protecteurs contre Listeria, r con-

naissant des peptides naturels de L. monocytogenes. En outre, la capacité du mutant actA à se multiplier de manière transitoire dans les organes des souris infectées et de sécréter une quantité suffisante de protéines bactériennes est probablement critique pour permettre une production efficace des lymphocytes CD8⁺ protecteurs.

Le transposon Tn917-lac s'est inséré dans actA, le second gène de l'opéron lécithinase, et a un effet polaire sur l'expression du gène plcB codant pour une lécithinase. Les résultats obtenus dans la présente invention indiquent que la lécithinase ne joue pas un rôle essentiel dans l'induction d'une immunité protectrice contre L. monocytogenes.

En conclusion, les résultats de la présente invention montrent que des mutants atténués actA sont capables d'induire des lymphocytes T CD8⁺ protecteurs contre *Listeria*, et qu'un état d'immunité protectrice contre L. monocytogenes de type sauvage peut être établi par une infection unique. Comme les mutants actA pénètrent dans le cytosol des cellules infectées et se multiplient dans ce compartiment, on peut considérer leur utilisation comme vecteur vivant pour délivrer des protéines hétérologues dans le cytosol et favoriser la production de lymphocytes T CD8⁺ ; de tels vecteurs vivants capables de se multiplier de façon transitoire sont supposés délivrer une charge suffisante de protéines hétérologues dans le cytosol, ce pendant une durée de temps courte. En plus de leur utilisation potentielle comme modèle pour le développement de vaccins mettant en oeuvre des vecteurs vivants, ces *Listeria* de virulence atténuée peuvent être utiles pour le criblage et la caractérisation de peptides bactériens ou parasitaires spécifiques d'allèles du locus codant pour les molécules de classe I du CMH. En effet, certaines bactéries et certains parasites résident dans les compartiments vacuo-

lares ; en outre, la cinétique de croissance peut être faible. Ainsi, pour les espèces de Leishmania ou les espèces de Mycobacterium, cet outil pourrait être très utile pour définir la spécificité des lymphocytes CD8⁺ qui sont produits en réponse à l'infection.

25

Induction de la "propagation de lymphocytes T CD8⁺
protecteurs par le mutant actA de *L. monocytogenes* dans la
rate de souris C3H

Expérience	Expérience 1 (5×10^7 cellules)	Expérience 2 (1×10^8 cellules)	Expérience 3 (2×10^8 cellules)
Transfert de cellule	- + + +	- + + + +	- + + +
Transfert <i>in vitro</i>	- C' anti-CD4 + C' anti-CD8 + C'	- C' anti-Thyl + C' anti-CD4 + C' anti-CD8 + C'	- C' anti-CD4 + C' anti-CD8 + C'
<i>Listeria</i> \log_{10} par cellule	$6,70 \pm 0,14$ $4,00 \pm 0,19$ $4,60 \pm 0,45$ $6,25 \pm 0,39$	$6,51 \pm 0,16$ $2,53 \pm 0,32$ $6,16 \pm 0,20$ $3,59 \pm 0,34$ $4,89 \pm 0,64$	$6,75 \pm 0,21$ $2,51 \pm 0,45$ $3,20 \pm 0,32$ $5,36 \pm 0,25$
<u>VALEUR de P</u> Cellules traitées contre pas de cellules	- < 0,001 < 0,001 < 0,05	- < 0,001 NS < 0,001 < 0,01	- < 0,001 < 0,001 < 0,001
Cellules soustraites contre cellules traitées par C	- - NS < 0,001	- - < 0,001 < 0,05 < 0,01	- - NS < 0,001

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Les cellules spléniques ont été isolées à partir de souris C3H au jour 7 après injection intraveineuse de $1,5 \times 10^7$ mutants actA. Les cellules Thy-1⁺, CD4⁺ ou CD8⁺ ont été soustraites *in vitro* avant le transfert adoptif. Les anticorps monoclonaux utilisés ici étaient Anti-Thy-1, 2 J1j (ATCC TIB 184), anti-CD4 RL1724 (Ceredig, R. Lowenthal, J.W. Nabholz M. and MacDonald, H.R., 1985, *Nature* 314 98), et anti-CD8 31M (Sarmiento M. Glasebrook A.L. et Fitch F.W., 1980, *J. Immunol.* 125-2665). La déplétion était < 90% après chaque traitement cytotoxique par des anticorps monoclonaux (résultats non représentés). Les populations cellulaires non déplétées [complément (C')] ou déplétées ont été transférées chez des "récepteurs" naïfs syngéniques 1 heure après injection de $4 \text{ à } 8 \times 10^4$ *L. monocytogenes* de type sauvage. Les groupes témoins comprenaient des récepteurs de cellules non déplétées (c'est-à-dire incubées seulement avec C') et des récepteurs recevant seulement une injection de *L. monocytogenes* de type sauvage (c'est-à-dire pas de cellules). 48 heures après l'injection, les bactéries ont été comptées (moyenne + ET) dans la rate des "récepteurs" (3 à 5 souris par groupe). La signification statistique (test de Student) est rapportée pour l'efficacité du transfert (cellules traitées contre pas de cellules) et pour l'effet du traitement de déplétion sur l'efficacité du transfert (cellules déplétées contre cellules traitées par C').

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 1. Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M. and Sansonetti, P. J. (1990). Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 59, 1048-1058.
- 10 2. De Rycke, J., Phan-Thanh, L. and Bernard, S. (1989). Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 983-988.
- 15 3. Domann, E., Leimeister-Wächter, M. Goebel, W. and Chakraborty, T. (1991). Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* 59, 65-72.
- 20 4. Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- 25 5. Kuhn, M., Prévost, M.-C., Mounier, J. and Sansonetti, P.J. (1990). A nonvirulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerisation of actin. *Infect. immun.* 58, 3477-3486.
- 30 6. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

7. Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.-A., Milon, G. and Cossart, P. (1991a). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* 5, 2273-2283.
8. Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P. (1991b). Identification of a novel operon involved in virulence of *Listeria monocytogenes*; its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 59, 1043-1049.
9. Racz, P., Tenner, K. and Szivessy, K. (1970). Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. I. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelial cells. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 17, 221-236.
10. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
11. Shaw, J.H. and Clewell, D.B. (1985). Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin-B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bact.* 164, 782-796.
12. Vazquez-Boland, J.-A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud J., and Cossart, P. (). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.*, Jan. 1992, p. 219-230.
13. Tilney, L.G. Connelly, P.S. and Portnoy, D. A. (1990). Actin filament nucleation by the bacterial

pathogen, *Listeria monocytogenes*, J. Cell. Biol. 111, 2979-2988.

- 5 14. Sullivan et al., Gene, 1984, 29, p. 21-26.
- 15 15. Leredus et al., Gene, 1991, 108, p. 115-129.
- 10 16. North, R.J. and Deissler, J.F., 1975, Nature of "memory" in T-cell mediated antibacterial immunity cellular parameters that distinguish between the active immune response and a state of "memory". *Infect immun.* 12 761.
- 15 17. Alonso J.M. Vilmer, E. Mazigh D. and Mollaret, H.M., 1980, *Yersinia enterocolitica* O3 Curr. Microbiol. 4 117.
- 20 18. Dunn P.L. and North R.J., 1991, Resolution of primary murine listeriosis and acquired resistance to lethal secondary infection can be mediated predominantly by Thy 1⁺ CD4⁺ CD8⁺ cells, J. Inf. Dis 164 869-871.

LISTE DES SEQUENCES

I - INFORMATION GENERALE

5

(1) DEMANDEUR : INSTITUT PASTEUR

(2) TITRE DE L'INVENTION :

10

Mutant atténué de Listeria monocytogenes,
souche recombinante de Listeria monocytogenes,
utilisation comme vecteurs hétérologues d'anti-
gène vaccinal et utilisation comme vaccin ou
composition diagnostique.

(3) NOMBRE DE SEQUENCES : 1

15

II - INFORMATION POUR SEQ ID N° 1

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : protéine

LONGUEUR : 610 aminoacides

TYPE DE MOLECULE : protéine de surface

20

ORIGINE

ORGANISME : Listeria monocytogenes

LIGNEE CELLULAIRE : LO 28

CARACTERISTIQUE

NOM DE LA PROTEINE : produit du gène Act A

25

III - DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

-29 MGVRFGRAMVVTITANCITTFDIIFA

30

```

1  ATDSEDSSLNTDENEFEKTEZQPSEVNTGPRIETAREVSSROIKE
46  LEKSNKVRNTNKADLIAMLKKEAKGPNIMNNSEQTENAAINEE
91  ASGADRPATQVERRHPGLPSDSAAEIKKRRKAIASSDSELESITY
136 PDKPTKVNKKKVAKESVADASESDLOSSHQSADESSPQPLKANQQ
181 PFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLTK
226 KKSEEVNAS
235 DFFPPPTDEELRLALPETPHLLGFNAPATSEPSFF
270 EFPPPTDEELRLALPETPHLLGFNAPATSEPSFF
305 EFPPPTDEELRLALPETPHLLGFNAPATSEPSFF
350 DFFPIPTEEELNGRGR
367 PTSEEFSSLNSG
379 DF TDENSET
389 TEEEDRLADLRDRGTGKESRNAGFLPLNPFASSPVPSL
428 SPKYSKISAPALISDITKKTPTFNQPSQPLNVTNKRITTKTVTKPE
473 TPVKTA PKLAELPATKPOETVLAKEMKTFIEKQAEITNQSINMP
518 LPVIQKATEASDKEEHKPTQTEZRWVEESASAMAMGNRSAGIEE
563 GKLIKASAEDEKAKEEPGNHTTLTAMLAIGVPSIAGPRTKTIOL
607 RKNM

```

35

SYMBOLES DES ACIDES AMINES

		A	Ala	alanine
5		C	Cys	citéine
		D	Asp	acide aspartique
		E	Glu	acide glutamique
		F	Phe	phénylalanine
10		G	Gly	glycine
		H	His	histidine
		I	Ile	isoleucine
		K	Lys	lysine
15		L	Leu	leucine
		M	Met	méthionine
		N	Asn	asparagine
		P	Pro	proline
20		Q	Gln	glutamine
		R	Arg	arginine
		S	Ser	serine
		T	Thr	thréonine
		V	Val	valine
		W	Trp	tryptophane
		Y	Tyr	tyrosine

REVENDECATIONS

1. Mutant atténué de Listeria monocytogenes comportant, dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci, une mutation apte à bloquer ou modifier
5 sensiblement l'expression de la protéine codée par le gène act A.

2. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mutation consiste en une insertion, une délétion ou une
10 mutation par mutagenèse dirigée.

3. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la mutation consiste en l'insertion d'un transposon stable.

4. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 3, caractérisé en ce que le transposon stable est le transposon Tn917-lac.
15

5. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est effectuée dans le fragment d'ADN codant pour la séquence peptidique à motifs répétés comprise entre les aminoacides 235 à 315, 350 à 360, 367 à 385 et 389 à 393 de la séquence SEQ ID n°1.
20

6. Mutant atténué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la mutation consiste en une insertion entre les aminoacides 61 et 62 de la séquence peptidique SEQ ID n° 1.
25

7. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 6, dénommé LUT 12, déposé à la CNCM le 30 janvier 1992 sous le n° I-1167.
30

8. Vaccin humain ou vétérinaire, caractérisé en ce qu'il comprend en tant que composant actif une souche mutante atténuée de Listeria monocytogenes selon l'une des revendications précédentes.
35

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9. Souche recombinante de Listeria monocytogenes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ADN hétérologue, soit inséré dans le génome d'un mutant atténué selon l'une des revendications précédentes, soit porté
5 par un plasmide qui se réplique dans le mutant atténué.

10. Souche recombinante selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'ADN hétérologue consiste en un gène hétérologue codant pour un antigène protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

10 11. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène bactérien, notamment de mycobactéries.

12. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène parasitaire, notamment de Leishmania, de Trypanosoma
15 ou de Toxoplasma, Theileria.

13. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène viral, notamment du VIH, du virus de la chorioméningite lymphocytaire ou du virus de la grippe.
20

14. Souche recombinante selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'antigène est l'antigène gag et/ou l'antigène nef du VIH et/ou tout ou partie de l'enveloppe gp 120 du VIH1 ou gp 140 du VIH2.

25 15. Souche recombinante l'une des revendications 9 à 14, caractérisée en ce qu'elle comporte un promoteur de Listeria en amont de l'ADN hétérologue.

16. Souche recombinante selon la revendication 15, caractérisée en ce que le promoteur est le
30 promoteur hly.

17. Souche recombinante selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'ADN hétérologue est fusionné avec le début du gène hly, de manière à utiliser la séquence signal de la listeriolysine O pour sécréter
35 le produit de l'ADN hétérologue dans le cytoplasme de la

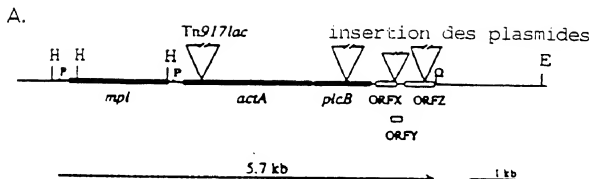
cellule hôte.

18. Vaccin humain ou vétérinaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend en tant que composant actif une souche recombinante selon l'une des revendications 9 à 17.

19. Composition de diagnostic comprenant une souche recombinante de Listeria monocytogenes selon l'une des revendications 10 à 17, pour le contrôle de l'état de protection d'un hôte humain ou animal contre une infection provoquée par un microorganisme comprenant un antigène sensiblement identique à celui codé par le gène hétérologue inséré dans la souche mutante recombinante ou porté par un plasmide se répliquant dans la souche mutante recombinante.

15

1/1



B.

-29 MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFA

 1 ATDSEDSSSLNTDEWEEFEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKE
 46 LEKSNKVRNTNKADLIAM~~LEKEA~~EGPNINN~~NNN~~SEQTENAAINEE
 91 ASGAD~~RPAIQ~~VERRHPGLPSD~~SAAEIK~~RRKAIASSDSELES~~LT~~Y
 136 PDKPTKV~~NKKK~~VAKESVADASESDLDSSMQSAD~~ESSPO~~LKANQQ
 181 PFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAI~~VDKS~~AGLIDQL~~LL~~TK
 226 KKSEEVNAS
 235 DFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSE~~PSSF~~
 270 EFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSE~~PSSF~~
 305 EFPPPPTEDELEIIRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNF~~S~~
 350 DFPPPIPT~~EEEL~~NGRGG~~R~~
 367 PTSEEFSSLSNG
 379 DF TDDENSET
 389 TEEEDRLADLRDRGTGKHSRNAGFLPLNPFASSPVPSL
 428 SPKVS~~KISAPALISDIT~~TKTTPFKNPSQPLNVFNKKT~~TTKT~~VT~~TK~~PKP
 473 TPVK~~TAPK~~LAELPATK~~PQET~~VLRENKTPFIEKQ~~AETN~~KQSINMP~~S~~
 518 LPV~~IQE~~ATE~~SD~~KEEMK~~PQ~~TEEK~~MVEE~~SESANNANGKNRSAGIEE
 563 GKLI~~AKSA~~EDEKAKEE~~PGNH~~TTLLI~~AM~~LAIGV~~SL~~GAFIK~~II~~LOL
 607 RKNH

FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ : C12N 15/74; C12N 1/21; C12N 15/01; A61K 39/02 //C12N 15/31
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC (C12N 1/21, C12R1:01)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ : C12N; C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INFECTION AND IMMUNITY. Vol. 58, No.11, November 1990, WASHINGTON US pages 3770-3778 A.N. SUN ET AL 'Isolation of listeria monocytogenes Small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread' *see the whole document in particular page 3775 left-hand column *	1-4
A	INFECTION AND IMMUNITY. Vol. 60, No.1, January 1992, WASHINGTON US pages 219-230 JOSE-ANTONIO VAZQUEZ-BOLAND ET AL 'Nucleotide sequence of the lecithinase operon of Listeria monocytogenes and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread' cited in the application see page 226, right-hand column see page 228, right-hand column see abstract	1-4
A	INFECTION AND IMMUNITY --- ./.	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 1993 (23.06.93)

Date of mailing of the international search report

13 July 1993 (13.07.93)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00105

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Vol. 58, No.11, November 1990, WASHINGTON US pages 3477-3486 M. KHUN ET AL 'A non-virulent mutant of Listeria monocytogenes does not move intracellularly but still induces polymerization of actin' cited in the application see the whole document ---	
P,X	CELL. Vol. 68, 7 February 1992, CAMBRIDGE, MA US pages 521-531 C. KOCKS ET AL 'L. monocytogenes - induced Actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein' see the whole document ---	1-19
P,X	EMBO JOURNAL. Vol. 11, No.5, May 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1981-1990 E. DOMANN ET AL 'A novel bacterial virulence gene in Listeria monocytogenes required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin' see the whole document ---	1-2
A	MOLECULAR MICROBIOLOGY Vol. 5, No.9, 1991, pages 2273-2283 MENGAUD J. ET AL 'Pleiotropic control of Listeria monocytogenes virulence factors by a gene that is autoregulated' cited in the application see the whole document ---	1-4
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Vol. 174, No.2, January 1992, pages 568-574 TRINAD CHAKRABORTY ET AL 'Coordinate regulation of virulence genes in Listeria monocytogenes requires the product of prfA gene' *see the whole article, especially pages 571 right-hand column lines 28-31, page 572 lines 41-49 and page 573 lines 3-10* -----	1-2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 93/00105

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si les symboles de classification sont applicables, les indiquer) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/74; //C12N15/31(C12N1/21,C12R1:01)	C12N1/21; C12N15/01;	A61K39/02
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 58, no. 11, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 3770 - 3778 A. N. SUN ET AL 'Isolation of listeria monocytogenes Small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread' * le document en entier plus particulièrement page 3775 colonne de gauche *</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: right;">-/-</p>	1-4
<p>¹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
23 JUIN 1993	13. 07. 93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	LE CORNEC N.D.R.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁶		
(SUITE DES RENVIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)		
Catégorie ¹⁷	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 60, no. 1, Janvier 1992, WASHINGTON US pages 219 - 230 JOSÉ-ANTONIO VAZQUEZ-BOLAND ET AL 'Nucleotide sequence of the lecithinase operon of <i>Listeria monocytogenes</i> and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread' cité dans la demande voir page 226, colonne de droite voir page 228, colonne de droite voir abrégé</p> <p>---</p>	1-4
A	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 58, no. 11, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 3477 - 3486 M. KUHN ET AL 'A non-virulent mutant of <i>Listeria monocytogenes</i> does not move intracellularly but still induces polymerization of actin' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-4
P,X	<p>CELL. vol. 68, 7 Février 1992, CAMBRIDGE, NA US pages 521 - 531 C. KOCKS ET AL 'L. monocytogenes-induced Actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-19
P,X	<p>EMBO JOURNAL. vol. 11, no. 5, Mai 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1981 - 1990 E. DOMANN ET AL 'A novel bacterial virulence gene in <i>Listeria monocytogenes</i> required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-2
A	<p>MOLECULAR MICROBIOLOGY vol. 5, no. 9, 1991, pages 2273 - 2283 MENGAUD J. ET AL 'Pleiotropic control of <i>Listeria monocytogenes</i> virulence factors by a gene that is autoregulated' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-4

-/--

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 174, no. 2, Janvier 1992, pages 568 - 574 TRINAD CHAKRABORTY ET AL 'Coordinate regulation of virulence genes in <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> requires the product of the <i>prfA</i> gene' * see the whole article , especially pages 571 right column lines 28-31 , page 572 lines 41-49 and page 573 lines 3-10 * -----</p>	1-2